

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav pro životní prostředí**

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana Životního prostředí



Bc. Josefína Mavrogeni

**Využitelnost otolitů okouna říčního (*Perca fluviatilis*) k určení změny v trofické síti pomocí analýzy stabilních izotopů C a N**

Applicability of river bass otoliths (*Perca fluviatilis*) to determine change in trophic web using C and N stable isotope analysis

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslava Frouzová, Ph.D.

Praha 2022

**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že cituji všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato diplomová práce, ani její podstatná část, nebyla použita k získání stejného, nebo jiného akademického titulu. Zároveň prohlašuji, že práce v tištěné formě je totožná s elektronickou prací vloženou do SIS.

V Praze: 8.2022

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce Ing. Jaroslavě Frouzové, Ph.D za veškerou pomoc poskytnutou během zpracování práce, za komentáře k práci a její vstřícné vedení. Ráda bych také poděkovala RNDr. Znachorovi, Ph.D. za poskytnutá data. Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli se zvládnutím laboratorních úskalí, která mě během zpracování vzorků potkala. Především Kateřině Čákové, která mi ukázala laboratoř a přístroje, které jsem potřebovala. Také bych ráda poděkovala své rodině za trpělivost.

## Abstrakt

Využití rybích otolitů okouna říčního ve studiích zaměřujících se na jeho trofickou pozici ve společenstvu pomocí SIA je možné. Pro analýzy spoléhající se na uhlík je jejich užití dokonce možné i bez úpravy vzorků otolitu, jak bylo potvrzeno v literatuře už v minulosti. Ovšem pokud se jedná o použití analýzy dusíku, jde o trochu složitější proces. Dusíku je v otolitech tak malé množství, že bez předúpravy vzorku je hmotnostním spektrometrem naprosto nedetekovatelný. Nám se podařilo z otolitů extrahovat dusík, který je ve struktuře uzamčen díky proteinům zajišťujícím jeho krystalizaci. Zjistili jsme, že jeho obsah je dostatečný k analýze, ale pouze ve frakci tvořené rozpustnými proteiny. Z nerozpustné frakce bylo možné získat výsledky jen pro uhlík, proto frakce nebyla k vyhodnocení použita. Proces extrakce dusíku není příliš složitý, a i při využití otolitů okounů, které jsou poměrně malé, je možné získat výsledky. Malá velikost a váha otolitů okouna však znemožní použití jednotlivých otolitů od jednotlivých ryb. Z toho důvodu byly v práci použité souhrnné vzorky. Pro tento postup je nutné mít k analýze navážku 100mg rozemletého otolitu. To byl další důvod, proč byly v práci použité souhrnné vzorky. Po vyhodnocení SIA pro  $^{15}\text{N}$  bylo zjištěno, že v rozmezí let 2004 a 2021 dochází k relativnímu obohacování otolitů o těžší izotop N. U uhlíku naopak výsledky ukázaly, že v rozmezí těchto let dochází k mírnému ochuzování otolitů o  $^{13}\text{C}$ .

## Abstract

The use of fish otoliths of river bass in studies focusing on its trophic position in the fish community using SIA is possible. For analyzes relying on carbon, their use is even possible without treatment of otolith samples, as has been confirmed in the literature in the past. However, when it comes to nitrogen analysis, it is a slightly more complicated process. The amount of nitrogen in otoliths is not very high so it is completely undetectable with a mass spectrometer without a preliminary treatment of the samples. We managed to extract nitrogen from the otoliths, which is locked in the structure thanks to the proteins conducting its crystallization. After this extraction its content was sufficient for analysis, but only for the fraction that is made up of osoluble proteins. It was possible to get results for the insoluble fraction only for carbon, that is the reason why results of this fraction were not used. The process of nitrogen extraction

is not very complicated, and even when using perch otoliths, which are relatively small, it is possible to get results. However, the small size and weight of perch otoliths will preclude the use of individual otoliths from individual fish. For that reason, summary samples were used for analysis. For this procedure, it is necessary to have a sample of 100 mg of ground up otoliths for analysis. This was another reason why summary samples were used in this work. After evaluating SIA for  $^{15}\text{N}$ , it was found that between the years 2004 and 2021 there is a relative enrichment of the otoliths with the heavier N isotope. For carbon, on the other hand, the results showed that there is a slight depletion of  $^{13}\text{C}$  in the otoliths over the years.

# Obsah

1 Úvod.....	1
2 Otolity .....	3
2.1 Otolitický orgán a otolit .....	4
2.3 Vývoj otolitu .....	7
3 Izotopy .....	12
3.1 SIA.....	14
4 Cíle práce .....	17
4.1 Hypotézy.....	17
5 Metodika.....	18
5.1 Vzorky .....	18
5.2 Vodní nádrž Římov.....	18
5.3 Zpracování vzorků.....	19
5.3.1 Příprava otolitů .....	21
5.3.2 Čištění otolitů .....	21
5.3.3 Demineralizace .....	22
5.3.4 Příprava IOM.....	23
5.3.5 Příprava SOM .....	24
5.3.6 Měření .....	25
6 Výsledky .....	28
6.1 Tříletí okouni.....	28
6.2 Okouni starší 4 let.....	32
6.3 Porovnání výsledku 3letých okounů a okounů starších 4 let .....	35
7 Diskuse.....	38
8 Závěr .....	45
Literatura .....	47

# 1 Úvod

Analýza stabilních izotopů je dnes běžně využívána v ekologických studiích zaměřujících se na prostředí vodních ekosystémů. Často jsou zájmovým organismem v těchto studiích ryby, a jejich ekologie a etologie. Tyto studie nejsou celosvětově nijak výjimečné, a hodnoty naměřené pomocí analýzy stabilních izotopů z různých orgánových soustav ryb mají prokázané výsledky (Fry, 2006; Post, 2002). Velmi často se využívají šupiny (Vašek, 2021), svalová tkáň (Eldson, 2010), tkáně různých orgánů a ploutevní ústřížky (Vašek, 2017). Tyto tkáně jsou použitelné pro širokou škálu ekologických studií, ku příkladu výzkumu migrace ryb za potravou (Cunjak, 2005), zjišťování původu ryb a jejich rozmnožovacích migrací (Hoffman, 2016) a k určení trofické pozice ryb (Post, 2002). Zjišťování trofické pozice a nik ryb se zabývají autoři i v České republice (Vašek, 2018).

Obecně se využití otolitů už dlouhodobě realizuje pro určení věku ryb a pro určení ročních přírůstků, přibližně od padesátých let 20. století (Campana & Thorold, 2001). Využití jejich chemického složení, a obsahu prvků ve struktuře, a strukturálních vlastností se začalo aplikovat až na přelomu století 20. a 21. (Campana, 2005). Použití jejich izotopového signálu bylo ze začátku uskutečňováno ve studiích týkajících se rekonstrukcí migrací a původu ryb, kde se využívalo především stroncium (Kennedy 2002). Aplikace v enviromentálních studiích zaměřujících se na prostředí ryb a jejich změny se pozvolna rozvíjí současně s ostatními studii prostředí využívajícími stabilní (i radioaktivní) izotopy. Tedy přibližně od konce 20. století. Podle dostupné literatury se rozvoj používání analýzy stabilních izotopů obsažených v otolitech používá stále častěji i v enviromentálních studiích. Tento vývoj jde ruku v ruce s vývojem ostatních disciplín, které s tím souvisejí (na příklad zdokonalování strojů schopných realizovat izotopové analýzy) (Campana, 2005).

S tímto postupem se zanedlouho začalo publikovat i využití izotopů v otolitech i ve studiích zaměřených na potravní vztahy a návyky ryb. Prozatím je využitelnost otolitů v takovýchto studiích spíše sporadické, i když existuje několik studií z přírodních podmínek (McMahon, 2011), i studií z laboratorního prostředí (Eldson, 2010; Grønkvær, 2013). Otolitům se přisuzuje teoretický velký potenciál použití v environmentálních studiích díky jejich specifickým vlastnostem, i když ve většině studií se používá ve spojení s nimi

hlavně analýza uhlíku, kterého je v otolitu dostatek. Analýza dusíku se používá podle Eldsona 2010 je interpretace výsledků izotopové analýzy z nekontrolovaných podmínek mnohem složitější, než se dosud myslelo. Také zmiňuje, že výsledky, které získal ve svém laboratorním experimentu nekorespondují s některými zažitými předpoklady o diskriminaci uhlíku a dusíku během příjmu potravy. To potvrzují i výsledky Vandena a Rasmussena (2001). Tedy určení trofických pozic může mít svá úskalí i při použití rychle se obměňujících tkání, jako jsou například svaly, jejichž analýza je jednoduchá a vzorky není třeba před analýzou dusíku nijak zvlášť upravovat (díky vysokému obsahu). Z toho důvodu by inertní struktura otolitu mohla být potenciálně vhodná pro analýzu.

V České republice jsme první, kdo se snaží využít otolity a jejich izotopový signál k získání informací o potravních vztazích a o environmentálních faktorech ovlivňujících okouny. Jejich otolity byly v archivu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Pro jejich využití jsme se rozhodly díky zahraničním publikacím a jejich výsledkům s příslibem získání relevantních výsledků z této práce.

Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci, které byla rešeršní prací a zabývala se obecným využitím otolitů v ekologických studiích a využitím otolitů a jejich izotopového signálu (pouze stabilních izotopů) v těchto studiích.



## 2 Otolity

Otolity jsou struktury připomínající vzhledem i složením kamínky. Jsou tvořeny uhličitanem vápenatým. Vyskytují se u všech kostnatých ryb (*Teleostei*), jak sladkovodních, tak mořských. Tyto struktury jsou ve zvířecí říši unikátem. Přestože většina obratlovců má ve vnitřním uchu podobné struktury tvořené uhličitanem vápenatým, většinou jsou ve formě malých mnohonásobných "otolitů" připomínajících prachové shluky. Tyto shluky se nazývají otoconia. Pouze u ryb se vyskytuje jeden kompaktní otolit (Popper, 2005). V rybím těle jsou otolity jedinou strukturou, která je tvořena uhličitanem vápenatým. Přestože se v těle vyskytují i jiné kalcifikované struktury/tkáně jako například kosti, zuby, nebo šupiny. Tyto struktury/tkáně jsou bohaté na uhlík, ale nejsou acelulární a chemickým složením jsou tvořeny fosforečnanem vápenatým (Radtko, 1982). Převážná většina obratlovců má tři otolitické orgány (kromě savců, ti mají pouze dva otolitické orgány) (Thomas, 2019). Vyskytují se ve vnitřním uchu ryby a jsou součástí statokinetického orgánu (ve vodním prostředí se nedá mluvit o udržování rovnováhy, ale spíše o schopnosti orientace těla vůči gravitaci). Tyto orgány jsou rozloženy tak, že jeden zaujímá pozici posteriorní, další anteriorní a poslední zaujímá pozici horizontální (Popper, 2005). Jedná se o tři půlkruhové kanálky, které jsou párovými orgány a tím pádem jsou i otolity párovými strukturami. Celkem se ve vnitřním uchu ryby vyskytují tři otolity. Každý z nich krystalizuje v jiné části. Tyto tři části se nazývají Lagena, Urticle a Saccula a každá je samostatným otolitickým orgánem. Otolitické orgány navazují na půlkruhové kanálky. Hlavní funkce otolitů je pomoci rybě orientovat své tělo ve vodním prostředí (hlavně tedy orientovat hlavu), vůči působení gravitace a také je velmi zásadní jejich spoluúčast na sluchových funkcích. Principem zajištění těchto fyziologických funkcí je působení změn tlaku vody a gravitačních sil na celé rybí tělo a následné vnitřní reakce na tyto změny (Popper, 1982).

Otolitické orgány u ryb jsou různě velké, a přestože se jejich funkce neliší, jejich vnitřní prostředí je trochu jiné. Velikostní rozdíly mají vliv i na velikost a způsob biokrystalizace otolitu. Obecně je u všech kostnatých ryb největším otolitem Saggita, která krystalizuje v otolitickém orgánu nazývaném se Saccula. Z tohoto důvodu se Sagitta používá nejčastěji k výzkumu (Campana, 1999). Další dva otolitické orgány v sobě uchovávají otolity Asteriscus (Lagena) a Lapillus (Urticle) (Obr.1). Všechny tyto tři otolity jsou z

uhličitanu vápenatého, ale postupným růstem se diferencují ukládáním minerálů do krystalové struktury. Sagitta a Lapillus se formují do struktury aragonitu a Asteriscus se formuje do struktury vateritu. Může se ovšem stát, že z fyziologických důvodů jedince, nebo i během dorůstání ryby, neodpovídají struktury daných otolitů obecně platným normám a jejich struktura může představovat jiný biominerál. Nejčastější z těchto anomálií je kalcitová struktura (Oliveira, 1996). Tyto anomálie mohou být způsobeny změnami pH nebo prvkových poměrů v endolymfě, kterou je otolitický orgán vyplněn, a která hraje zásadní roli v biokrystalizaci a ve fyziologickém fungování celého otolitického orgánu (Gauldie, 1990). přestože biokrystalizace je proces podmíněný stejnými vnitřními pochody, ryby jsou stejně jako ostatní organismy individuální a některé fyziologické procesy mohou i u ryb stejného druhu probíhat rozdílně. Tyto rozdíly jsou pozorovatelné mezi různými populacemi stejného druhu z jiných lokalit. Takový rozdíl může být způsoben ekologickými podmínkami, jako na množstvím dostupné potravy a živin. Rozdíly mohou být i mezi jedinci stejné populace. Většinou mají ovšem příslušníci jedné populace velmi podobné otolity (Obr.2), což naznačuje přímou spojitost mezi procesem biokrystalizace a prostředím (Souza, 2020).

Otolity mají ve své struktuře uložené i organické složky. Je to tím, že otolit obklopuje endolymfa, která je bohatá na organické sloučeniny. Také dochází v otolitickém orgánu k sekreci stavebních proteinů do endolymfy pomocí specializovaných buněk (viz. níže). Obsah organické složky v otolitu je způsobena tím, že během cirkadiálního tvoření struktury dochází k ukládání části dominované anorganickou složkou i k ukládání na proteiny bohatou složku (viz. níže) (Wang, 2011). V endolymfě bylo rozpoznáno více než 380 proteinů (Thomas, 2019a). Proteiny patří k různým proteinovým skupinám a mají v endolymfě zásadní a specifické funkce. Tyto funkce jsou u některých proteinů jsou popsány níže (a také v tab.1).

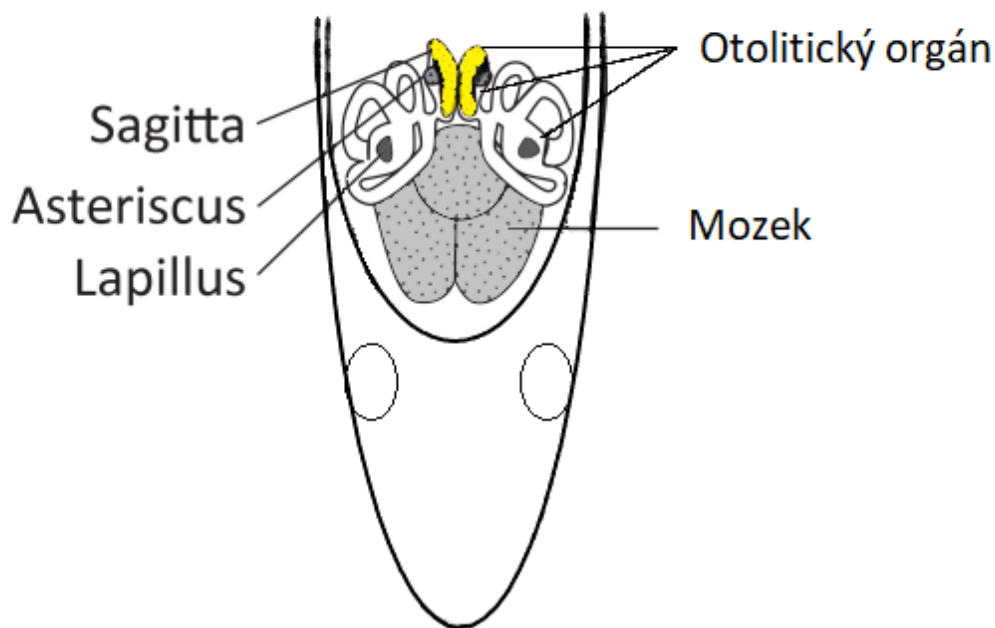
## 2.1 Otolitický orgán a otolit

Fungování otolitických orgánů je převážně na bázi mechanoreceptivních interakcí mezi otolitovou membránou a vnitřním povrchem otolitického orgánu. Nejlépe je v tomto ohledu známý prostor Sacculus a jejího otolitu Saggity. Je to z toho důvodu, že je největším otolitickým orgánem a tedy i Saggita je největším z otolitů. Proto je také

nejlehčí zkoumat princip fungování otolitických orgánů na Sacculu. Přestože většina studií zmiňuje konkrétně Sacculu a Saggiu, zjištění se dají aplikovat i na ostatní otolitické orgány (Thomas, 2019; Murayama, 2002; Popper, 2005). Vnitřní prostor je vystlán sensorickým epitelem a v něm se nachází několik typů specializovaných buněk. Pro mechanické vnímání pohybu otolitu jsou přizpůsobené zejména sensorické buňky vláskovitěho typu, na jejichž povrchu jsou výběžky řasinkových shluků. Tyto řasinkové výběžky jsou hlavními receptory pro přenos vzruchů a zajišťují interakci a předávání vzruchu z otolitu na sensorický epitel vystylající otolitický orgán (Murayama, 2002). Vzruch se aktivuje ve chvíli, kdy dojde k ohybu řasinkových výběžků, na jejichž povrchu jsou kanály schopné po ohybu řasinek přijmout signál a spustit kaskádu chemických reakcí, vedoucích k přenesení informace do mozku ryby (Popper, 2005). Často se v otolitickém orgánu vyskytuje konkrétní místo, kde je širší vrstva epitelu, a které je želatinózní. Tento epitel obsahující největší počet vláskovitých buněk s řasinkovými shluky se nazývá macula. V oblasti maculy se kromě sensorických buněk také buňky podpůrné (Popper, 2003). Tyto podpůrné buňky se pravděpodobně nevyskytují přímo na macule, ale spíše v její těsné blízkosti, jelikož funkce těchto buněk není sensorická. Podpůrné buňky jsou propojeny s otolitem pomocí membrány, kterou je otolit obalen. Tato membrána na jeho povrchu je pórovitá a propojená s podpůrnými buňkami (Dunkelberger, 1980). Vzájemné propojení membrány a podpůrných buněk má funkční charakter, který zajišťuje udržení otolitu na místě. Zároveň zajišťují kontakt otolitické membrány se všemi buňkami v epitelu vnitřního ucha, které zajišťují jednotlivé procesy vedoucí ke správnému růstu otolitu (Thomas, 2019). Otolit je přibližně trojnásobně hustší než rybí tělo, proto jsou jeho pohyby ve vnitřním uchu rozdílné od pohybů těla, proto může docházet ke kontaktu otolitu a epitelu otolitového orgánu a tento pohyb může být detekovatelný řasinkami (Ladich & Popper, 2004).

Macula a její okolí má kromě mechanoreceptivních funkcí také zásadní funkce ovlivňující krystalizaci. Jednou z takových funkcí je funkce sekreční. Pravděpodobně je macula a její těsné okolí hlavním místem, ve kterém dochází k uvolňování jednotlivých organických sloučenin, které iniciují a zajišťují krystalizaci. V několika publikacích byly sekreční buňky popsány, ale Weigele (2017) buňky zajišťující sekreci popsal jako podpůrné buňky 2. typu. Zatímco jiní autoři tyto buňky označují jako buňky granulární, které se dělí podle

typu sekrece. V některých pracích jsou buňky granulární spojovány pouze se sekrecí proteinů, a zároveň popisují ionocyty, které se mají starat o sekreci iontů, jako ku příkladu hydrgenuhličitanů. Některé práce popisují granulocyty jako buňky starající se o sekreci jak proteinů, tak iontů. Jelikož některé zásobují endolymfu proteiny a jiné ionty, tvořící krystal (Tomash, 2019). Obecně je typů buněk zajišťujících sekreci proteinů a iontů do endolymfy ve vnitřním uchu několik. Některé se doopravdy vyskytují přímo v oblasti maculy, jiné v její těsní blízkosti. Pro představu si můžeme oblast vnitřního ucha představit jako kruh. Na jeho vrchní vnitřní stěně je macula, vedle níž jsou oblasti takzvané síťovité oblasti (oblast obsahu buněk podpůrných a některých sekrečních). Celý kruh je vyplněn endolymfou a přibližně v jeho středu je uchycen otolit v želatinózní membráně. Naproti macule, na spodní stěně kruhu, je oblast obsahující několik "plošek", ve kterých jsou uloženy buňky dlaždicového tvaru, které zajišťují zásobování endolymfy ionty (Mayer-Gostan, 1997). Nalezneme zde hlavně 4 druhy buněk s rozdílnými funkcemi. Buňky vláskovité s mechanorecepční funkcí předávající pomocí nervových spojení informace o orientaci hlavy, a i s funkcí sekreční pomocí řasinkových výběžků na jejich konci. Buňky podpůrné propojené s membránou ochraňující otolit. Buňky granulární, jejichž primární funkce je sekreční. Buňky nazývané ionocyty, které se starají o sekreci iontů do endolymfy a na jejichž povrchu jsou většinou aktivní iontové pumpy. Distribučně jsou specializované buňky ve vnitřním uchu rozmístěny následovně: na macule buňky granulární, vláskovité a část podpůrných, v oblasti síťové jsou buňky podpůrné a ionocyty větších rozměrů, a v oblasti plošek jsou ionocyty malých rozměrů (Pisam, 1998).



Obr.1: Schéma rybí hlavy s vyznačenými otolitickými orgány a jednotlivými otolity s jejich umístěním. Žlutě vyznačené jsou Sagitty, které bývají nejčastěji používané a zpracováváné pro analýzy, nebo pro odečet věku ryby. Původní obrázek je převzat z Chittaro (2020), použitý je upravený.

### 2.3 Vývoj otolitu

Otolity mají hned několik výhod oproti některým ostatním materiálům používaných v ekologických studiích. Nejzásadnější však je fakt, že otolit je naprosto acelulární struktura, která je inertní a nepodléhá téměř za žádných podmínek jejich resorpci. Ku příkladu na rozdíl od kostí, které podléhají pravidelně obměně buněk. Aby došlo k resorpci, musel by být jedinec vystavený obrovskému metabolickému stressu (Fey,2022; Mugiya, 1989). Tento fakt umožní ukládání fyzikálně-chemických informací z prostředí, ve kterém se ryba během života vyskytovala, ve formě chemického složení otolitu. To se týká převážně ukládání stopových prvků a jejich izotopů (Campana, 1999). Také jako jediná struktura v rybím těle je schopná poskytnout informace o průběhu celého života ryby. Je to díky tomu, že k formování otolitu dochází během vývoje embrya. V této fázi vývoje se vytvoří cluster z glykoproteinů a glykogenů, tak zvaný prekursor, který je už v této fázi připojen k epitelu vnitřního ucha. Z tohoto prekursoru

se dalším vývojem embrya postupně stává primordium, které poté tvoří centrum otolitu. Jelikož je celá iniciace způsobená sekrecí proteinů, které se shlukují, je oblast primordia na proteiny nejbohatší částí otolitu (Pisam, 2002,). Oblast primordia následně udává strukturu tvořícího se otolitu (převážně směr a způsob ukládání minerálů) (Jolivet, 2008). Otolit je tak zcela první kalcifikovaná struktura vznikající v těle ryby během vývoje (Radtke, 1982). K přirůstání dalších “vrstev” otolitu dochází každý den. Tudíž dochází ke kontinuálnímu ukládání informací z prostředí. Tyto přírůstky jsou už výrazně ochuzené o organické složky oproti centru otolitu (Pannella, 1971).

Vývoj otolitu probíhá ve třech zásadních fázích. První fáze byla již nastíněna v předchozím odstavci. Tato fáze je tak zvanou fází ukotvení (přesný překlad je uvazování) a je to fáze při které vzniká prvotní otolitová membrána. Tento proces probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je shlukování proteinů vylučovaných podpurnými buňkami vyskytujícími se vedle maculy (otogelin je vylučovaný podpurnými buňkami a protein otolin je vylučován vláskovitými buňkami). Tento cluster zůstává celou dobu připojen k buňkám na macule (Wang, 2011). Tyto proteiny se často řadí do nadskupiny označované jako OPP proteiny (otolit precursor particles). Je tomu tak, protože jsou buď přímo obsažené v OPP nebo zajišťují jejich formaci (Stook-Vaughan, 2015). OPP jsou bohaté na glykoproteiny a byl v nich pozorován i glykogen, ale velmi důležitou složkou jsou organické sloučeniny, které na sebe vážou  $Ca^+$  ionty, které zajišťují prvotní krystalizaci. Tyto proteiny tak začnou tvořit semínka, která jsou pomocí nabitého povrch řasinek na vláskových buňkách (nebo kineticky) shlukována. Nejzásadnějším proteinem v prvním kroku je pravděpodobně otogelin (Thomas, 2019). Druhý krok spočívá v postupném připojování vzniklé otolitické membrány k receptivní oblasti maculy a podpurným buňkám (Stooke-Vaughan, 2015). Připojování je zajištěno sekrecí proteinů z řasinkových výběžků a jejich interakcí s povrchem membrány (interakce Alpha tektorinu, konkrétně nidogenové domény, s kolagenovou doménou otolinu). Po ukotvení vzniklé otolitové membrány a “semínek” otolitu dochází k započatí biokrystalizace (Thomas, 2019).

Druhou fází je samotná biokrystalizace. K přírůstku otolitů dochází každý den. Přirůstání je mimo jiných faktorů ovlivněno cirkadiálně. Z toho důvodu se v otolitech střídají vrstvy bohaté na organické sloučeniny s vrstvami bohatými na anorganické sloučeniny. Vrstva

anorganická se označuje jako zóna přirůstání (anglicky the incremental zone), vrstva proteinová se označuje jako zóna nespojitá (anglicky the discontinuous zone) (Mugiya, 1981). Toto přirůstání se jeví být závislé na vylučování thyroïdních hormonů a jejich kolísající hladině (Wang, 2001) (jsou to hormony štítné žlázy a mimo jiné funkce zajišťují správný růst organismů). Během soumraku a přes noc je na povrchu otolitu ukládána převážně nespojitá zóna. Naopak během dne je k otolitu připojována přirůstová zóna (Tohse, 2006).

Třetí fáze nastává po iniciativní inkrustaci otolitu prvními přirůstkami  $\text{CaCO}_3$  (Aragonitu). Probíhá podobně jako ve druhé fázi, cirkadiálně. A proces ukládání uhličitanu vápenatého a proteinů se nemění. Co se začíná objevovat, je rozdílný růst otolitu během zimy a během léta. Letní vrstva je relativně obohacena o anorganickou složku, zatímco u vrstvy přirůstající během zimy převládá ve vrstvě obsah organických složek. Díky tomu je možné pozorovat jednotlivé anuly (a určit věk ryby) (Dannevig, 1956). Hlavní skupinou proteinů podílejících se na přirůstání otolitu jsou ze skupiny karbohydráz. Karbohydrázy fungují jako katalyzátory během přeměny oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan. Z toho důvodu koncentrace oxidu uhličitého ve vodě pravděpodobně ovlivňuje přirůstání otolitu, a také způsoby přirůstání během dne a noci. Kromě jejich katalyzačních funkcí se podílejí také na regulaci růstu otolitu. Konkrétně jejich symetrického přirůstání a velikosti přirůstku (Tohse, 2006). Výčet proteinů podílejících se zásadně na ukládání uhlíku do otolitu a na vývoji otolitu, včetně proteinů interagujících s uhličitanem vápenatým, je v tabulce 1.



Obr. 2: Vzorky otolitů tříletých okounů ze stejného roku. Je u nich pozorovatelný střed a také nenápadné anuly. Většinou se anuly odečítají pomocí mikroskopu a podsvícením otolitu. Další možnost, jak odečíst věk ryby z anulů je spálením organické části, ovšem poté není možné dál pracovat s proteinovou částí otolitu. Přestože jsou tyto otolity odebrány stejně starým zástupcům stejného věku, je patrné, že nejsou všechny úplně stejné. Důvodem je rozdílnost každého jedince, přestože probíhají stejný proces, nejsou otolity identické. Tyto otolity byly velké přibližně 0,7 cm.

K biokrystalizaci by nemohlo docházet, kdyby endolymfa nebyla obohacována hydrogenuhličitanem (přeměna je zajištěna karbohydrázami z  $\text{CO}_2$ , jak bylo popsáno dříve). Jeho regulaci zajišťují právě karbohydrázy. Jak se uhličitan vápenatý dostává do endolymfy zatím není jasné, pravděpodobně však jde o kombinaci pasivního transportu a aktivního transportu. Přirůstání otolitu je komplexnější, než se na první pohled může zdát. Kromě proteinů (enzymů) starajících se o přirůstání jsou v endolymfě obsaženy i proteiny, které tento proces inhibují. V otolitickém orgánu tak probíhá přesně naplánovaná souhra vyplavování inhibitorů a mineralizátorů (Thomas, 2019a). Celý proces probíhající biokrystalizace je závislý na složení endolymfy, ale také na složení okolní vody. Hlavním ovlivňujícím faktorem v endolymfě je pH, o jehož regulaci se starají karbohydrázy tím, že regulují hydrogenuhličitanem a protonové ATPázy typu V a jejich vyplavování do otolitického orgánu (Thomas, 2019). Hlavní faktory prostředí ovlivňující vývoj otolitu a způsob jakým se do něj budou ukládat stopové prvky (jejich obsah, zastoupení a poměry, i izotopů) jsou pH, teplota, salinita a koncentrační gradient prostředí (Eldson, 2008).

Přestože se v endolymfě obklopující otolit vyskytuje více než 380 proteinů s různými funkcemi, pouze přibližně 15 z nich patří do skupiny proteinů, které jsou rozpustné ve



vodě. Existuje několik publikací probírajících procesy vedoucí k biokrystalizaci otolitu a jejichž zájmem jsou skupiny proteinů obsažených v endolymfě. Práce tohoto typu (zabývající se mikrochemismem) se začaly objevovat v 90. letech 20. století, ale dodnes nejsou identifikované všechny proteiny a nejsou řádně prozkoumané procesy dějící se ve vnitřním uchu vedoucí k iniciaci tvorby otolitu a přesných mechanismů vedoucích k pravidelnému dorůstání (především konkrétně funkce jednotlivých proteinů). Přibližně asi čtyřiceti z identifikovaných proteinů byla přiřazena specifická funkce (Thomas, 2019a). Tyto rozpustné proteiny jsou s největší pravděpodobností proteiny, které byly v rozpustné frakci našich vzorků, a které poskytly výsledky pro naši práci.

Výhodami otolitů tedy jsou: inertnost, nepodléhají resorpci; kontinuální přirůstání (na rozdíl od měkkých tkání, které se obměňují); vysoká odolnost, dají se uchovávat v archivech po dlouhá léta bez speciálních požadavků (není je třeba udržovat zamražené ani v exikátorech); možnost použít i otolity nalezené během paleontologických výkopů díky jejich "minerálnímu složení" a odolnosti.

protein	Funkce	Skupina
Otogelin	Propojení otolitové membrány s maculou	Pr. otolitové membrány
$\alpha/\beta$ -tectorin	Připojení otolitu k řasinkovým výběžkům	Pr. otolitové membrány
Vápníková ATPáza	Zajišťuje přenos $\text{Ca}^{2+}$ přes plasm. membránu	Pr. loutového transportu
Otoc1	Zásadní pro založení otolitu, váže $\text{Ca}^{2+}$	Otoconiny
Myosin9 lehký řetěz	Váže $\text{Ca}^{2+}$ , pravděpodobně součást řasinek	Myosiny
Osteonectin	Váže $\text{Ca}^{2+}$ , váže kolagen	Pr. bohaté na cystein
Otolin-1	Váže $\text{Ca}^{2+}$ , formuje strukturní kolageny	Precerebelární proteiny
Karbohydrázy 1 a 6	Přeměna $\text{CO}_2$ na $\text{HCO}_3^-$ , regulace pH	Karbohydrázy
Otolitový marix pr.-1	Strukturní protein, váže $\text{HCO}_3^-$	Transferiny
Protonová ATPáza typu V	Kontrola Ph v otolitickém orgánu	Pr. loutového transportu

Tab.1: Výčet proteinů zásadních pro průběh a iniciaci biokrystalizace. Některé z těchto proteinů by mohly být proteiny ve struktuře otolitu (Thomas, 2019). Zkratka pr. značí protein.

### 3 Izotopy

Většina existujících prvků má několik svých izotopů. Izotopy označujeme atomy téhož prvku, které jsou identické až na počet neutronů. Počet protonů zůstává u všech izotopů daného prvku neměnný, tudíž i jejich chemické vlastnosti jsou neměnné. Díky rozdílnému počtu neutronů má tento atom rozdílnou hmotnost oproti ostatním izotopům daného prvku.

S rozdílnou hmotností (rozdílná atomová hmotnost) se zásadně mění fyzikální vlastnosti izotopů. K zásadním rozdílům patří hlavně stálost. Změna atomové hmotnosti může způsobit, že daný izotop se stane nestálým a může podléhat radioaktivnímu rozpadu. Z toho důvodu se izotopy dělí na izotopy stabilní (vnitřní síly v atomu jsou stabilní, a proto nepodléhají samovolným rozpadům) a nestabilní (podléhají samovolnému rozpadu tzv. radioaktivnímu). Nestabilní izotopy jsou proto označovány jako radioaktivní izotopy. Jejich stabilitu nebo nestabilitu způsobuje poměr protonů a neutronů (obecně suma nukleonů) v atomu a jejich vzájemné působení pomocí elektrostatických sil a přitažlivost jaderných sil. Také mají rychlejší poločas rozpadu. Tato práce je orientovaná na stabilní izotopy, proto se dále o radioaktivních izotopech nebude zmiňovat.

Další zásadní rozdíl mezi izotopy způsobený rozdílnou hmotností je v tom, že lehčí izotopy často jednodušeji participují na chemických reakcích. Tento fakt je také důvodem jejich relativního poměrového zastoupení na Zemi. Kupříkladu vodík má 3 formy. Vodík a deuterium jsou stabilními izotopy, tritium je radioaktivní a z těchto dvou izotopů je mnohem zastoupenější vodík. Konkrétně vodík ( $^1_1\text{H}$ ) mající jeden proton a jeden neutron je v přírodě častější (99,985%), než deuterium ( $^2_1\text{H}$ ) mající jeden proton a dva neutrony, který je poměrně vzácný (0,015%) (Šantrůček, 2014). V případě naší práce se budeme zabývat dusíkem a uhlíkem. V přírodě je lehčím a hojněji zastoupeným izotopem dusíku izotop  $^{14}\text{N}$  (těžší je  $^{15}\text{N}$ ) a uhlíku izotop  $^{12}\text{C}$  (opět lehčí izotop, těžší je  $^{13}\text{C}$ ). Procentuálně se v přírodě vyskytují v hodnotách  $^{14}\text{N}$  99,634% a  $^{15}\text{N}$  0,366%. U uhlíku je procentuální zastoupení následující  $^{12}\text{C}$  1,1056% a  $^{13}\text{C}$  98,894%. Ovšem existují i výjimky, kde je těžší izotop zastoupen častěji než lehký. Takovými výjimkami jsou bor a lithium (Fry, 2006).

Poměr mezi lehčím a těžším izotopem daného prvku se dá spočítat vydělením méně zastoupeného (minoritního) izotopu izotopem více zastoupeným (majoritním) výsledkem je hodnota označovaná R, která je bezrozměrná (Šantrůček, 2014).

$$R = \text{minoritní izotop} / \text{majoritní izotop}$$

Toto poměrové zastoupení se samostatně v praxi velmi často nepoužívá, právě kvůli častému velmi malému zastoupení těžšího izotopu. Hodnota R se však používá při dalších výpočtech. Především k výpočtu relativního zastoupení prvku v nějakém substrátu. Tento výpočet pracuje se standardy. Jako standardy se historicky začaly používat suroviny, které byly kdysi v dostatečné míře k dispozici. Tyto suroviny byly vybrány díky jejich izotopové homogenitě a staly se z nich standardy pro další analýzy (tab.2). Standardy, které se používají pro výpočet relativního izotopového poměru ( $\delta$ ), jsou ve své podstatě poměrem těžšího izotopu daného prvku vůči lehkému izotopu daného prvku z těchto surovin. Hodnota standardů je nulová, podle jejich definice (Fry, 2006). V dnešní době byla většina těchto surovin již vytěžena. Z toho důvodu se používají standardy laboratorně připravené, které se značí s velkým V na začátku zkratky. Toto značení představuje slovo Vienna, kde je sídlo Mezinárodní agentury pro atomovou energii, která se podílela na laboratorní přípravě “moderních” standardů (Šantrůček, 2014).

$$\delta = [(R_{VZ} - R_S) / R_S] * 1000, \delta = [‰]$$

Výpočet relativního izotopového složení látek ( $\delta$ ) odhalí relativní obohacení, nebo ochuzení látky o daný izotop vůči těmto standardům. Pro zjištění relativního izotopového složení vůči standardu se vypočítá odečtením hodnoty standardu od hodnoty izotopového poměru ve vzorku a následným vydělením získané hodnoty hodnotou standardu. Jelikož se delta udává v promilích, je výsledek vynásoben 1000. V případě, že je ve vzorku více zastoupen těžší izotop oproti standardu, je vzorek obohacen o daný izotop. Pokud je ve vzorku více zastoupen lehčí izotop daného prvku, potom je vzorek ochuzen o těžší izotop daného prvku (Fry, 2006). Tedy pokud je hodnota  $\delta < 0$ , je vzorek ochuzen o těžší izotop. Pokud je hodnota  $\delta > 0$ , je vzorek obohacen o těžší izotop (Šantrůček, 2014).

V ekologických studiích zaměřujících se na potravní vztahy organismů jsou nejčastěji používány izotopy uhlíku a dusíku, pro něž jsou standardy i s jejich hodnotami vypsány v tabulce 2.

Mezinárodní standard	Značení	Poměr izotopů	Hodnoty izotopového poměru
PeeDee Belemnite	VPDB	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,011189
Air	VAIR	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,003677

Tab.2: Tabulka s mezinárodními standardy a jejich hodnotami. Tyto hodnoty se označují R, které je bezrozměrnou jednotkou, dokud není použito pro další kvantifikace. Dle definice pro standardy vychází hodnota R nulová, díky tomu se dá použít jako reference při izotopové analýze.

### 3.1 SIA

Zkratka SIA je zkratkou pro Stable Isotope Analysis. Volným překladem by se dalo slovní spojení přeložit jako analýza stabilních izotopů (Šantrůček, 2014). Izotopové složení látek v přírodě není homogenní. Především, když jde o složky živé přírody. Je to z toho důvodu, že během chemických reakcí dochází ke změně izotopového složení látek. Tyto změny ve složení se nazývají frakcionací. Během frakcionace se mění izotopové složení látek z původního na jiné v průběhu chemických reakcí. V ekologii potravních vztahů je hlavním objektem zájmu tzv. asimilační frakcionace neboli trofická frakcionace. Trofická frakcionace je proces, ke kterému dochází během příjmu potravy a začleňování nutrientů z potravy do vlastní biomasy. Zpravidla je během chemických reakcí preferován lehčí izotop daného prvku, díky nižší molekulové hmotnosti (Gannes, 1997), a díky tomu, že těžší izotopy zpravidla tvoří silnější a stabilnější vazby v molekulách (Fry, 2006). Z toho důvodu se lehké izotopy ve velké míře nepodílí na tvorbě nové biomasy organismů.

Dusík a jeho izotopy jsou v potravní ekologii velmi významnými ukazateli potravních vztahů. Během inkorporace do tkání dochází k obohacení organismů o těžší izotopy vůči jejich potravě. V literatuře se běžně píše o obohacení přibližně 3,4‰ a s touto hodnotou se běžně pracuje během výpočtu trofické pozice (Peterson & Fry, 1987; Post, 2002). Tato hodnota však nemusí být vždy přesná. Hodnota je závislá na typu potravy, na typu

konzumenta a na typu habitatu (Vander Zanden, 1997). Pokud se zaměříme na druh potravy, tak McCutchan (2003) popsal, že trofická frakcionace uhlíku je u býložravců často vyšší než u karnivorů. Podobné výsledky pro uhlík pozoroval i Eldson (2010), který zkoumal vztah mezi druhy potravy (jejich izotopové složení a obsahu živočišné a rostlinné složky) a stabilními izotopy ve svalech a otolitech konzumentů. Zjistil, že v případě kdy byl zdroj potravy složen z kombinace rostlinné a živočišné, byly výsledky na pomezí, zatímco rostlinná strava znamenala větší frakcionaci a potrava složená z masa znamenala menší frakcionaci. Jeho výsledky ukazovaly podobné výsledky i při měření dusíku. To má pravděpodobně souvislost se stravitelností potravy a metabolickými procesy, kterými musí potrava projít, a také s tím, že těžší izotopy tvoří stabilnější vazby a méně ochotně se podílejí na chemických reakcích. Výsledky C i N v jeho práci naznačují, že SIA v potravní ekologii, konkrétně trofická frakcionace závislá na přijímané potravě, je zásadní. Zároveň během svých pokusů zkoumal i vnitřní metabolickou frakcionaci mezi svalovinou a otolitem. Jeho výsledky ukazují, že tato frakcionace je tak malá, že se dá zanedbat a došel tak k závěru, že otolity jsou vhodným substrátem pro SIA potravních vztahů, za použití obou těchto prvků. Přestože podle většiny publikací nedochází k trofické frakcionaci mezi jednotlivými trofickými pozicemi v případě inkorporace uhlíku do nové biomasy (Šantrůček, 2014), některé publikace zkoumající trofickou frakcionaci popisují jiné výsledky. Konkrétně dochází k obohacení  $^{13}\text{C}$  nově vzniklé biomasy oproti potravě (Eldson, 2010; Sirot, 2017).

Okouni byly vybrány jako modelová ryba díky jejich potravní strategii. Jsou oportunističtí lovci, jejichž aktivita je nejvyšší během rozbřesku a soumraku (Craig, 1977). Celý svůj život jsou dravými rybami. Jako juvenilní se živí převážně zooplanktonem a později se živí larvami hmyzu. V dospělosti jsou piscivorní (Ceccuzzi, 2011) s častým kanibalismem (Persson, 2000). Tím pádem jsou získané informace o trofické pozici za použití SIA a tkáně okounů lehce vyhodnotitelné. Nárůsty izotopového signálu by měly vykazovat typické hodnoty nalézané u dravců.

Kromě určování trofické pozice recentní se dají otolity a jejich izotopové složení použít i u vzorků z historie. To je obecně velkou výhodou otolitů. Bez speciálního zajišťování vydrží léta, a pokud jsou skladovány jednotlivě v uzavíratelné nádobě, nebo v uzavíratelných sáčkách, nevdají ani rozbití vzorku (Rowell, 2010). Dále se tato

kombinace běžně používá k určení migrací (dlouhých i krátkých) (Cunjak, 2005), určení původu ryb, určení změny v prostředí během života ryby, nebo změny salinity prostředí (Campana, 1999). Ideálním způsobem zpracování otolitů k SIA by bylo oddělení jednotlivých anulů od sebe a získáním informací pro jednoho jedince, ale toto zpracování má své limity. Zatím není realizovatelnost zpracování otolitů tímto způsobem pro SIA potvrzená.

Analýza se provádí pomocí hmotnostní spektrometrie často značené zkratkou IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry). Hmotnostní spektrometry jsou připojené k počítačovým programům zajišťujícím celý proces analýzy. Tyto programy také zajišťují veškeré nastavení stroje, jako jsou například hladiny detekce pro dané prvky. Hmotnostní spektrometry jsou schopny analyzovat pouze zplyněné vzorky, proto je prvním krokem analýzy spálení vzorku. Jedná se tedy o destruktivní analýzu, což může být v některých případech (včetně této práce) nevýhodou. Po spálení vzorku se vzniklý plyn přidává k nosnému plynu, kterým je většinou inertní hélium. Spálený vzorek vstupuje spolu s nosným plynem do komory. Do komory kromě vzorku a nosného plynu vstupuje také referenční plyn o známém izotopovém složení, většinou jeden ze standardů. V komoře analyzátoru je iontový zdroj emitující elektrony, které interagují s vnějšími orbitaly zplyněného vzorku za vzniku kationtů. Rychlost kationtů je poté zvýšena a jsou dále nesený do štěrbiny, která ústí do prostoru s elektromagnetem. Působením elektromagnetu je dráha kationtů ohýbána. Díky tomu a díky rozdílné hmotnosti jednotlivých kationtů (právě díky rozdílnému izotopovému složení vzorku) dochází k rozdílným v trajektorii dráhy izotopů. Dráhy jsou zaznamenávány pomocí detektoru složeného z několika Faradayových kolektorů a naměřené výsledky jsou zapsány do chromatogramu. Během celého procesu je naprosto zásadní, aby nebyl vnitřní prostor stroje kontaminován vnějším okolím. Z toho důvodu je v oblasti komory vytvořené prostředí vakua (Šantrůček, 2014).

## 4 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda jsou otolity sladkovodních ryb vhodným materiálem pro izotopovou analýzu ve vodách České republiky. Konkrétně, zda je jejich použití vhodné pro zjišťování trofické pozice, trofické niky a potravních trendů. Při SIA zaměřující se na trofické pozice je zásadním prvkem zájmu dusík, proto bylo dalším cílem zjištění, zda je v otolitech okouna říčního dostatek materiálu obsahujícího dusík na provedení izotopové analýzy. Pokud by bylo, dalším cílem by bylo zjistit, jestli je možné provést analýzu zároveň pro uhlík a dusík, tedy zjistit poměrové zastoupení uhlíku a dusíku ve vzorcích. Díky získání vzorků ryb různého věku je dalším cílem zjistit, jestli má věk a velikost ryby vliv na velikost otolitů jim odebraných a na izotopové složení otolitů (popřípadě zda ryby žijící na daném místě déle, než tři roky mají zásadně rozdílné složení, než ryby tříleté). Zjistit zda bude možné z izotopového signálu dusíku indikovat případný posun v základu potravní sítě okounů, který by mohl nastat na základě publikovaných informací o zvýšení přísunu alochtonní organické hmoty do nádrže v důsledku klimatické změny (Vašek et al., 2021). Otolity se jako médium vybraly hlavně díky jejich vlastnostem, který byly popsány v kapitole otolity.

### 4.1 Hypotézy

Hypotézy byly pro tuto práci nastaveny následující:

H<sub>0</sub>: Izotopový signál <sup>15</sup>N i <sup>13</sup>C se bude v průběhu 20 let sledování v otolitech měnit.

H<sub>1</sub>: V otolitech bude dostatek dusíku k SIA.

H<sub>2</sub>: Otolity z recentních let budou obohaceny o <sup>15</sup>N oproti prvním rokům odlovů.

## 5 Metodika

Metodika pro úpravu vzorků v naší práci byla převzata z článku publikovaného v roce 2013. Tato publikace byla vybrána díky popisu extrakce proteinové složky otolitů (Grønkjær, 2013).

### 5.1 Vzorky

Vzorky, které jsou v práci používány, jsou otolity z okouna říčního (*Perca fluviatilis*). Tyto otolity byly uloženy v archivu Biologického centra Akademie věd České republiky (zkratka AVČR) v Českých Budějovicích. K jejich odběru došlo během pravidelných odlovů, ke kterým dochází na vodní nádrži každý rok na přelomu léta a podzimu.

K dispozici jsme měly otolity z několika let mezi rokem 2004 a 2021 (včetně). Počet otolitů z jednotlivých odlovů a korespondujících archivovaných vzorků z jednotlivých let není stejný pro každý z nich. Z některých let nebyly archivovány žádné vzorky otolitů. Naopak v některých letech byly odlovy pravděpodobně úspěšnější a z těchto let bylo otolitů dostatečně velké množství. Díky tomu bylo možné rozdělit některé vzorky otolitů z některých let na vzorky odebrané okounům tříletým a vzorky otolitů odebrané okounům čtyřletým a starším (ve skupině starších ryb byly otolity odebrané okounům od 4 do 10 let věku). To se provádělo také proto, že prvotním záměrem bylo soustředit se pouze na otolity tříleté. Když jsme měly vzorky k dispozici, rozhodly jsme se použít i od starších ryb. Bez chybějících let byly tedy k dispozici otolity z 15 let (chybějící vzorky jsou z let 2008, 2007, 2005). V některých případech bylo dostatečné množství otolitů pro provedení dvou opakování pro daný rok.

### 5.2 Vodní nádrž Římov

Místem odběru vzorků byla vodní nádrž Římov (48°50', 14°30'E). Vodní nádrž Římov je zdrojem pitné vody pro České Budějovice, nachází se na spodním toku řeky Malše, která je hlavním tokem zásobujícím vodní nádrž vodou (Obr.3). Byla vybudována v sedmdesátých letech 20.století vybudováním přehrady a zatopením údolí o délce 13,5 km. Díky tomu má nádrž kaňonovitý tvar. Maximální hloubka nádrže je 43 metrů a průměrná hloubka je 16 metrů. Celá rozloha nádrže je 2,06 km<sup>2</sup> (Šimek, 2008).



Ve vodní nádrži docházelo po napuštění údolí k velmi intenzivní biomanipulaci, hlavně kvůli regulaci fytoplanktonu, než došlo k ustálení rybí komunity (Říha, 2009). Přesto ale k dodatečnému dosazování okouna do nádrže nedocházelo, takže ryby lovené po roce 2000 jsou ryby vykulené ve vodní nádrži. Jejich otolity tím pádem zcela odpovídají podmínkám vodní nádrže.



Obr.3: Vodní nádrž Římov na řece Malši. Na pravé straně je město Velešín a na levé Sv. Jan pod Malší.  
(zdroj: Mapy.cz)

### 5.3 Zpracování vzorků

Otolity jsou struktury uhličitanu vápenatého nacházející se ve vnitřním uchu ryby. Svým složením jsou převážně z anorganického materiálu. Struktura uhličitanu vápenatého má v sobě uzamčené i proteinové složky, protože endolymfa obklopující otolity obsahuje proteiny (Campana, 1999). Během tohoto procesu se tak do jejich struktury ukládají i části proteinové (organické) složky, která je v malých koncentracích v otolitu uzamčena. Tato organická část může být obsažena v míře blízké až 10 % z celkové váhy otolitu (Sasagawa, 1996). Z toho důvodu je vhodné pokusit se použít pro studii týkající se

trofické pozice tu část otolitu, která je proteinová. Nejen pro dusík, ale i pro uhlík. Uhlík v otolitu je totiž měřitelný i bez extrakce proteinové části, ale v tom případě dochází hlavně k měření anorganického uhlíku tvořícího strukturu  $\text{CaCO}_3$ , který je přijímán z prostředí (Solomon, 2006).

Při izolaci proteinové části otolitu by mělo dojít k získání přesnějších výsledků, které nebudou zatíženy anorganickým uhlíkem. Doposud se používaly ve studiích (a nejen souvisejících s trofickou pozicí a potravními návyky, ale veškerých ekologických studiích) otolity celé. Při měření celých otolitů dochází k měření celkového uhlíku, který je složen z veškerého přijímaného uhlíku (metabolického i nemetabolického). Izolaci se připraví vzorek na compound – specific SIA, která je vhodnější než bulk SIA díky větší přesnosti (McMahon, 2010).

Při určování trofické pozice, nebo při ekologických studiích zabývajících se potravními vztahy se většinou analyzuje kromě uhlíku i dusík. Dusík je pro výpočet trofické pozice zásadní, jelikož s každou navýšenou trofickou pozicí je jedinec relativně obohacen o těžší izotop dusíku, tedy izotop  $^{15}\text{N}$ , vůči své potravě. V literatuře se běžně píše o obohacení přibližně 3,4‰ (tato hodnota se běžně používá k výpočtu trofické pozice) (Peterson & Fry, 1987). Tento popisovaný frakcionační faktor však může mít i výrazně jiné hodnoty v závislosti na potravě a na prostředí (ve sladkých vodách je častější získání jiných hodnot, hlavně pokud se jedná o uzavřená vodní tělesa, a také se odvíjí od potravy vybrané pro reprezentaci spodní hranice potravní sítě) (Post, 2002; Eldson, 2010). Z toho důvodu byla potřeba vybrat takový postup, aby se z otolitu podařilo izolovat oba prvky. Postup opsaný McMahonem v článku z roku 2011 se zaměřuje na aminokyseliny a uhlík obsažený v nich. Cheng ve svém článku z roku 2018 používá pro izolaci dusíku z otolitu oxidaci pomocí bakterií. Tyto postupy jsou poměrně zdlouhavé a složité. Navíc nejsou tyto způsoby úpravy pravděpodobně vhodné pro provedení SIA pro oba prvky.

Z toho důvodu se stal hlavním zdrojem pro zpracování našich otolitů článek z roku 2013, jehož autorem je Peter Grønkvær. Ve svém článku popisuje izolaci jak uhlíku, tak dusíku, pomocí demineralizace otolitů HCl a použití jejich organické části k provedení analýzy. Tento postup se zdál být na rozdíl od ostatních jednoduše proveditelný a s relevantními výsledky pro C i N.

### 5.3.1 Příprava otolitů

Z archivu Biologického centra AVČR bylo získáno 307 vzorků otolitů spolu s informacemi o vylovených rybách, kterým byly otolity odebrány. Odběr otolitů je poměrně jednoduchý, a probíhá po smrti ryby. Usmrčená ryba se uchopí tak, aby dorzální ploutev směřovala k zemi. Poté se rozevřou skřele a za posledním žaberním obloukem se žábry oddělí pomocí silných nůžek. Celá hlavová část se poté převrátí a tím dojde k vysunutí Sagitt, které se pinzetou vyjmou a jsou uskladněny v papírových pytlících.

Každý z otolitů byl zvážen, aby se daly předpřipravit k zpracování. Tyto váhy otolitů byly také použity ke zjištění vztahu mezi váhou otolitu a velikostí ryb. K analýze bylo třeba mít navážku 100 mg. Z toho důvodu se po předvážení vybralo tolik otolitů, aby se dala analýza provést s co nejvíce možnými opakováními. Během výběru se samozřejmě braly v potaz ztráty materiálu, ke kterým dochází během mletí a kvalitativním přesunům vzorků. Z většiny let nebylo dostatečné množství otolitů, proto jsme použily všechny dostupné otolity. To je také důvod, proč je v některých letech opakování a v některých ne.

Jednotlivé otolity byly rozděleny podle roku výlovu a podle toho, zda se jedná o ryby tříleté, nebo starší. Tyto otolity byly poté rozděleny do kádinek.

Velikosti vylovených ryb se často velmi lišily i mezi tříletými jedinci. Z toho důvodu nebylo v každém souhrnném vzorku stejné množství otolitů. Rozmezí bylo mezi třemi až osmi otolity na jeden vzorek k získání hmotnosti 100mg.

### 5.3.2 Čištění otolitů

Po vyjmutí otolitů z vnitřního ucha se rovnou z jejich povrchu odstraní tenká ochranná blanka. Přestože byly otolity z archivu, a předpokládaly jsme, že během odběru vzorků k tomuto očištění došlo, pro jistotu bylo provedené nové čištění.

Do kádinek s otolity se nalilo dostatečné množství 0,2 mol/l hydroxidu sodného, tak aby jeho hladina převyšovala cca o půl centimetru jejich povrch. Nechaly se v něm odstát hodinu. Po uplynutí daného času se vložily do ultrazvukové nádoby, kde se nechaly jednu minutu za intenzity sonikace 20kHz. Po dokončení sonikace se otolity jeden po druhém pomocí pinzet zkontrolovaly a byly zbaveny případných zbytků blanky z povrchu.

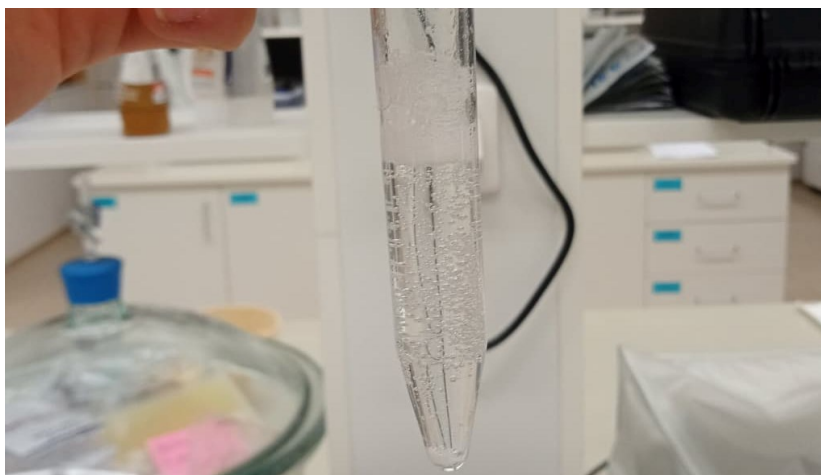
Posledním krokem bylo propláchnutí vzorků několikrát v MiliQ vodě, aby se z jejich povrchu odstranil hydroxid sodný.

Než se přešlo k samotnému zpracování otolitů demineralizací, byly vzorky vloženy do sušárny a byly sušeny 48 hodin při teplotě 30°C.

### 5.3.3 Demineralizace

Do jednotlivých eppendorfových zkumavek s víčkem byly vloženy otolity představující souhrnný vzorek včetně rezervy kompenzující potenciální ztráty vzniklé mletím a přenosem vzorku (vzorky se přenášely kvalitativně). Vysušené vzorky byly rozemlety na homogenní prášek pomocí automatického oscilačního mlýnu MM400. Homogenizace probíhala několika opakováními s kontrolami, aby bylo zajištěno co nejjemnější rozemletí. Jednotlivá mletí probíhala po dobu 5 minut frekvencí 20hz/s.

Do předvážených zkumavek se závitkem o objemu 15 ml bylo přeneseno 100mg zhomogenizovaného vzorku. Poté se do zkumavek přidaly 2 ml 0.1 mol/l kyseliny chlorovodíkové o teplotě 5°C a zkumavky se odložily do lednice vychlazené na 5°C. Nechávaly se odležet přibližně hodinu, dokud iniciativní fáze demineralizace neskončila (Obr.4). Poté se zkumavky vytáhly a jejich obsah byl jemnými krouživými pohyby promíchán. Dále do nich byly přidány 4,4 ml 0,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové o teplotě 5°C a opět byly vráceny do lednice vychlazené na 5°C. Tentokrát byly zkumavky ponechány v lednici přes noc (cca 12 hodin), aby mohla být demineralizace dokončena.



Obr.4: Průběh demineralizace otolitu po přidání 4,4 ml HCl pro dokončení procesu.

### 5.3.4 Příprava IOM

Demineralizace se prováděla, aby se ze vzorku odstranil anorganický uhlík držící jednotlivé strukturu pohromadě. V této struktuře byly uzamčeny organické části vzorku.

Organická část ve vzorku byla obsažena buď ve formě proteinů rozpustných (soluble organic matter – zkratka SOM), anebo ve formě proteinů nerozpustných (insoluble organic matter – zkratka IOM). Pro oddělení těchto dvou frakcí bylo třeba vzorek nechat odstředit v centrifuze schopné dosáhnout 14 400 otáček. Aby odstředění proběhlo bezpečně, byly vzorky přeneseny do polykarbonátových centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Vzorek byl přenesen kvantitativně.

Odstředování probíhalo v centrifuze Beckman Coulter ALLEGRA X-30R (rcf-30000), na které se nastavilo chlazení na 5 °C během centrifugace a rychlost odstředování na 14400 otáček za minutu. Odstředování probíhalo ve třech opakováních, kdy po každém opakování byla část supernatantu přenesena do zkumavky s mikrofiltrem. Každé odstředění trvalo 10 minut. Po ukončení se zbylý supernatant přenesl do dané zkumavky s mikrofiltrem. Na dně polykarbonátové zkumavky zůstala drobná sraženina (Obr.5), která se přenesla do předvážených cínových kapslí určených pro izotopovou analýzu. Kapsle se odložily do mrazáku, aby se s nimi jednodušeji manipulovalo a aby nedošlo k jejich vylití, dokud se nedokončila příprava SOM vzorků.

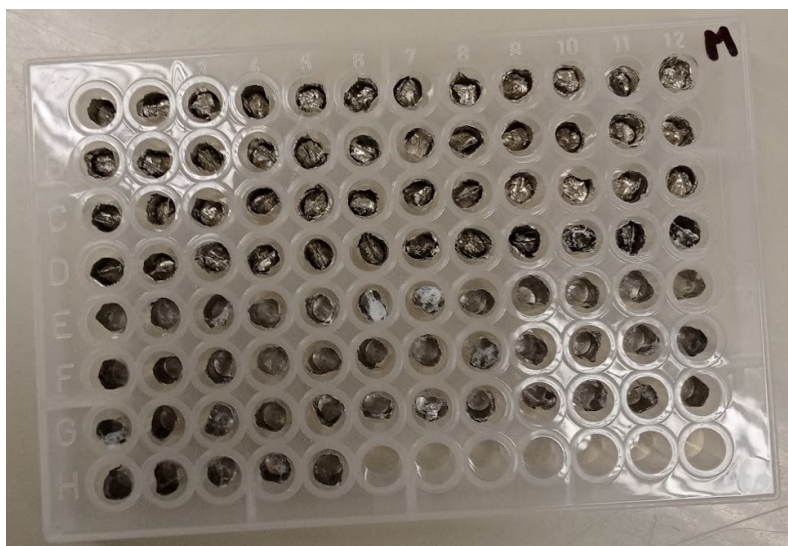


Obr. 5: Na dně polykarbonátové zkumavky je drobná sraženina tvořená nerozpustnou proteinovou frakcí z otolitu.

### 5.3.5 Příprava SOM

Supernatant, který byl přenesený do centrifugačních zkumavek Amikon ultra - 15 s mikrofiltrem pro zadržení proteinů o objemu 15 ml (propustnost pórů 10000 NMWL (nominal molecule weight limit)) byl odložen do lednice, dokud se nepokračovalo. Poté se zkumavky odstředily v centrifuze ROTOFIX 32A o otáčkách 4000r/m (rcf-4226). Jednotlivé centrifugace trvaly přibližně 80 minut. Po prvních 10 minutách bylo do zkumavky přidáno 3,5 ml MiliQ vody. Po dalších 15 minutách se opět přidalo 3,5 ml MiliQ vody. Během odstředování se zkumavky několikrát kontrolovaly. Když došlo k odstředění veškeré odstředitelné tekutiny pod filtr, považovalo se odstředění za ukončené. Ve filtru tak zůstal zkoncentrovaný vzorek obsahující rozpustnou proteinovou složku o objemu 150 - 200 $\mu$ l.

Aby došlo k využití veškerého materiálu, který zůstal ve filtru, došlo k opakovaným odběrům vzorku. Nejdříve bylo odebráno 50  $\mu$ l z tekutiny zachycené filtrem a poté byl vzorek lyofilizován. Po první lyofilizaci bylo do odpovídající kapsle vždy přidáno dalších 50 $\mu$ l z odpovídající zkumavky s mikrofiltrem. Během lyofilizace došlo u některých vzorků k vysunutí materiálu k hornímu okraji kapsličky (Obr.6) a bylo nutné je manuálně zasunout hlouběji, než došlo k přidání dalšího tekutého vzorku a následné opětovné lyofilizaci. Tento postup se opakoval celkem třikrát.



Obr. 6: Kazeta obsahující vzorky IOM a SOM po první lyofilizaci. Na místech E6 a E7 je vidět lyofilizovaná rozpustná organická složka obsažená v otolitu.

### 5.3.6 Měření

Po poslední lyofilizaci byly kapsle se vzorky uzavřeny a vytvořily se z nich drobné krychle. Vzorky byly měřeny v Centru výzkumu stabilních a radiogenních izotopů Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy na Albertově v hmotnostním spektrometru Delta V Advantage s přidruženým Conflo IV. Úprava kapsičky do drobné krychle se provádí, aby mohla kapsle projít trubičkou vedoucí do hmotnostního spektrometru a aby došlo k jeho spálení. Problematické bylo nastavení spektrometru, jelikož není zcela jasné, které z proteinů se ve vzorku vyskytovaly a v jakém jsou poměru ve vzorcích (především co se týče poměru uhlíku a dusíku). Nastavení citlivosti detekce v programu zajišťujícím průběh analýzy se z toho důvodu muselo víceméně odhadnout.

Vzorky připravené ke spálení a analýze se dají do sekvence s příslušným blanky a standardy. Do autosampleru se dávají nejdříve blanky, poté se tam dají odpovídající mezinárodní standardy. Sekvence posloupnosti s hmotnostmi byla vložena do počítačového programu, který zajišťuje chod průběhu, nastavení měření a nastavení kalibračních křivek pro dané měření. Hmotnostní spektrometr poté provedl analýzu vzorků vzhledem ke standardům a pro procentuální zastoupení prvků C a N ve vzorku.

Jedním z hlavních důvodů, proč jsme se rozhodly pro postup zaměřující se na organickou část obsaženou v otolitech, byl fakt, že pro naše vzorky analýza bulk vzorku nepřinesla žádné výsledky. Při prvních pokusech jsem se rozhodly rozemlít zkušební vzorky a pokusit se analyzovat vzorky bez úpravy. U těchto vzorků bylo odváženo několik kapslí o hmotnostech od 2 do 20 mg. Z těchto zkušebních vzorků byly nad detekci pro uhlík pouze dva vzorky, které měly hmotnost vyšší než 15 mg. Přestože otolitů bychom na takové navážky měly dostatek, uhlík z takových vzorků by byl složený z celkového uhlíku (anorganického i metabolického), zatímco dusík v otolitu by byl čistě organického původu. Z toho vyplývá, že by výsledky uhlíku mohly být zatíženy chybou způsobenou obsahem pro nás nezájmové části otolitu. Zároveň by bylo obtížné srovnávat poměry uhlíku a dusíky, vzhledem k tomu, že by nebyly do otolitu inkorporovány stejným způsobem.

Po vyhodnocení, že bude nejlepší použití organické části otolitu (a provedení všech úprav vedoucích k extrakci proteinové složky uložené v krystalové mřížce otolitu) se

vybraly 4 vzorky s nejnižšími navážkami. Dva vzorky obsahovaly nerozpustné proteinové složky otolitu a dva obsahovaly rozpustné proteinové složky otolitu. Tyto záměrně vybrané vzorky se nechaly zanalyzovat přednostně pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro tento postup jsme se rozhodly hlavně kvůli podezření, že se bude muset dále pracovat se vzorky, konkrétně že bude nutné vytvoření souhrnných vzorků pro ryby tříleté a pro ryby starší. Toto riziko nás na začátku vedlo k rozhodnutí použít právě i ryby starší než tříleté, přestože naší zájmovou skupinou byly hlavně ryby tříleté. Z tohoto měření jsme získaly velmi zajímavé výsledky. Pro rozpustné proteiny byly použitelné oba vzorky. U nerozpustných bylo zjištěno, že během analýzy je množství vzorku irelevantní (Obr.7). Paradoxně nám faktor pro detekci (amplituda měření) vyšel vyšší pro vzorek s menší navážkou. Pro měřitelnost dusíku ze vzorku je zásadní hodnota amplitudy, kde je možné získat výsledky pouze pokud je amplituda nad hodnotou 500. Z této tabulky tak vyplývá, že výsledky pro dusík je možné získat ze vzorků obsahujících SOM, na rozdíl od vzorků obsahujících IOM, kde to možné není.

	navážka	uhlík	dusík	d13C	d15N	ampl 28
JM 2014-B2I	0,044	:-)	:-)	-25,77	n.a.	192
JM 2018-B1I	0,086	:-)	:-)	-25,69	n.a.	44
JM 2021-B1	1,432	:-)	:-)	-25,70	13,0	1992
JM 2019-B1	1,469	:-)	:-)	-23,67	14,1	3190

Obr. 7: Tabulka výsledků zkušební analýzy pro zjištění změřitelnost izotopů dusíku a uhlíku ve vzorcích obsahujících SOM a IOM a pro nastavení hmotnostního spektrometru pro další měření. Položky s pozitivním emotikonem jsou měřitelné, položky s negativním byly pod hranicí detekce.

Dalším postupem tedy bylo dát dohromady veškeré vzorky obsahující IOM. Došlo tedy k vytvoření vzorků obsahujících vzorky 3letí i starší 4 let, včetně všech opakování, na rozdíl od SOM, kde byly k dispozici výsledky z obou kategorií. Přesto nebylo ani u jednoho ze vzorků obsahujících nerozpustnou složku proteinů možné změřit izotopy dusíku. Z toho důvodu byly pro další práci zavrhnuty všechny hodnoty získané analýzou IOM vzorků, které obsahovaly výsledky pouze pro uhlík. Výsledky, které v této práci prezentujeme, jsou tedy pouze výsledky z rozpustné frakce proteinové části otolitů.



Většina výsledků byla zpracovaná v excelu pomocí analýzy dat. Pro vývoj trendu byla použita regrese a spojnice trendů, pro potvrzení vzájemných vztahů byla použita Pearsonova korelace a pro vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými kategoriemi, tedy mezi 3letými okouny a věkovou kategorií zahrnující okouny starší 4 let ze stejných let, byly použity t-tesy. Primárně jsme chtěly zjistit, zda během let bude pozorovatelná změna v izotopovém signálu, popřípadě zda bude viditelný trend vývoje. Také nás zajímaly vztahy mezi jednotlivými získanými hodnotami. Dalším objektem zájmu bylo zjištění, v jakém poměru je ve vzorcích obsažen dusík a uhlík po úpravách vedoucích k izolaci proteinové části otolitů.

Během připravování vzorků se jednotlivé vzorky popisovaly podle kategorie ke které patřily a podle počtu opakování, pokud bylo možné provést opakování. Velké písmeno A v grafech a tabulkách u jednotlivých let značí, že se jedná o 3leté okouny, a číslo 1, nebo 2 značí opakování z daných let. Velké písmeno B v grafech u jednotlivých let značí, že se jedná o 3leté okouny, a číslo 1, nebo 2 značí opakování z daných let. Díky tomu, že v některých letech byl dostatek otolitů pro provedení opakování, se v těchto letech opakování provedla.

## 6 Výsledky

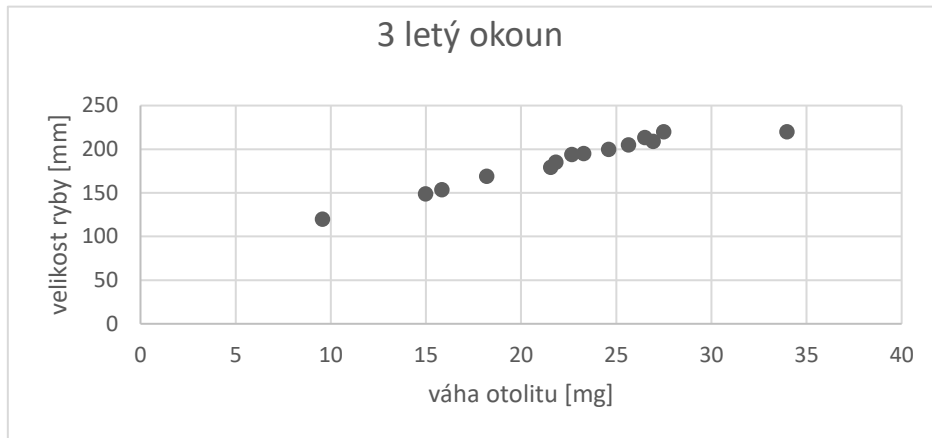
### 6.1 Tříletí okouni

V tabulce 3 jsou výsledky pro tříleté okouny z 11 let. Konkrétně od roku 2004 do roku 2021 (včetně), které na sebe navazují. Kromě chybějících let 2005,2006,2007, 2008. Je patrné, že ve vzorku je více zastoupen C než N. Z tabulky je patrné, že ve všech letech je ve vzorcích méně zastoupen  $^{13}\text{C}$ , jsou tedy ochuzeny o těžší izotop, vůči mezinárodnímu standardu. Také je patrné, že ve všech letech je ve vzorcích více zastoupen  $^{15}\text{N}$ , jsou tedy obohaceny o těžší izotop vůči standardu.

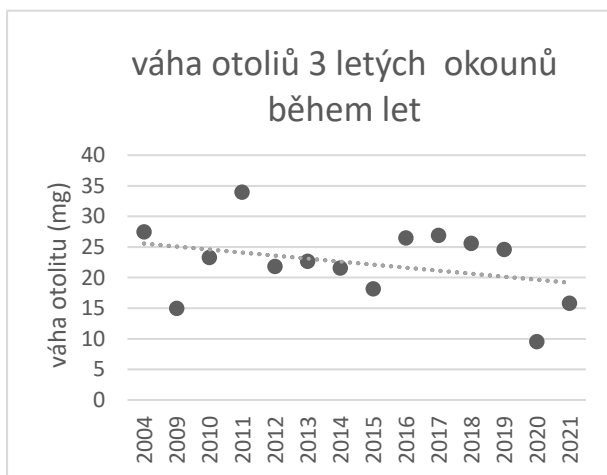
Sample	%C	%N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
2004 A	26,6 %	5,16 %	-23,32	13,85
2009 A	19,1 %	3,53 %	-24,54	11,42
2010 A	19,5 %	3,88 %	-24,23	10,09
2011 A	13,7 %	2,63 %	-25,08	10,22
2012 A1	15,8 %	3,34 %	-25,07	10,94
2012 A2	14,3 %	3,03 %	-24,89	10,76
2013 A1	31,3 %	6,67 %	-24,08	11,87
2013 A2	21,3 %	3,93 %	-24,72	11,65
2014 A1	16,1 %	3,06 %	-24,77	12,33
2014 A2	14,8 %	2,70 %	-24,97	12,52
2015 A	18,3 %	3,53 %	-24,43	13,11
2016 A1	19,6 %	3,99 %	-23,41	13,81
2016 A2	26,0 %	5,41 %	-23,07	13,71
2017 A	16,8 %	2,72 %	-24,54	12,90
2018 A1	13,4 %	2,38 %	-23,83	13,96
2018 A2	12,8 %	2,21 %	-24,02	13,45
2019 A1	15,9 %	2,92 %	-23,79	13,96
2019 A2	13,5 %	2,11 %	-24,52	13,57
2020 A	31,3 %	6,13 %	-23,81	13,83
2021 A1	10,1 %	1,56 %	-25,98	12,05
2021 A2	12,3 %	1,93 %	-26,04	11,93

Tab.3: Obsahuje hodnoty vypočítané programem pro zpracovávání výsledků z hmotnostního spektrometru. V prvních dvou sloupcích je poměr obsahu uhlíku i dusíku z daných vzorků. 3. sloupeček představuje hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  ze SOM frakce souhrnného vzorku. 4.sloupeček představuje hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  ze SOM frakce souhrnného vzorku. Písmeno A značí, že se jedná o tříletého okouna a číslice značí, počet opakování.

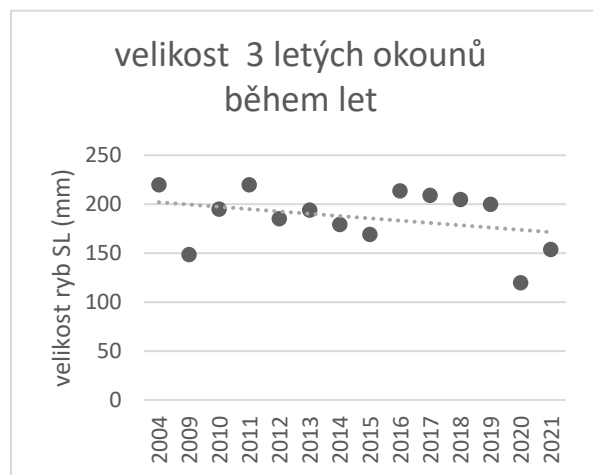
V grafu 1 je pozorovatelná korelace mezi velikostí ryb a váhami otolitů v daných letech a v daných odlověch ( $R^2= 0,9673$ ). Dá se tedy bezpečně prohlásit, že větší ryby mají těžší otolity u druhu okoun říční. Tomu také nasvědčují grafy 2 a 3, u kterých je u obou zřetelný klesající trend.



Graf 1: Vztah mezi velikostí ryb a váhou otolitů u tříletých okounů. Použité výsledky z let, které byly k dispozici. Hodnoty vah byly získány vytvořením průměru pro každý rok a data o velikostech byla získána z odlovné tabulky.



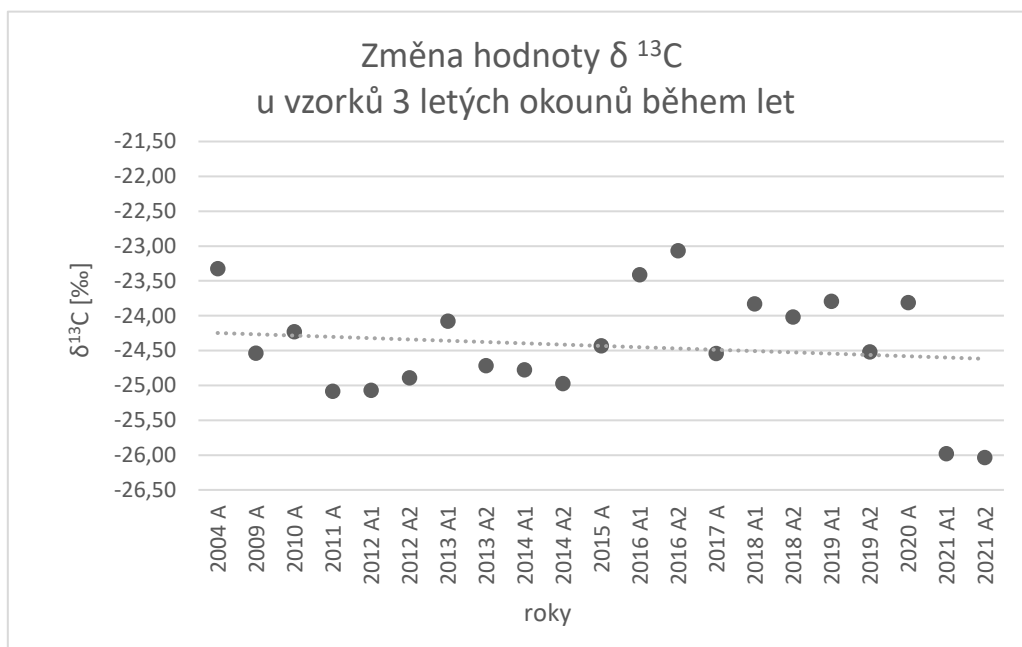
Graf 2: Průměrné váhy otolitů tříletých okounů v jednotlivých letech odlovů.



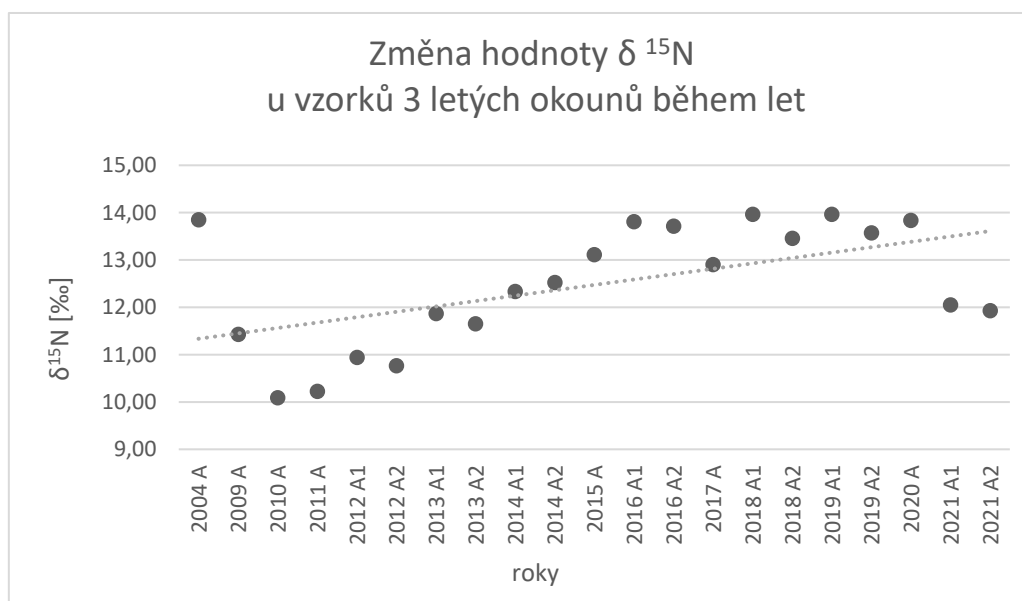
Graf 3: Průměrné velikosti tříletých okounů v jednotlivých letech odlovů.

Zmenšující se váha otolitů tříletých ryb z daných let následuje zmenšující se velikost tříletých ryb z daných let. Velikosti ryb jsou v mm a jsou měřeny pro SL (standard length=délka ryby měřená od tlamy po začátek ocasní ploutve).

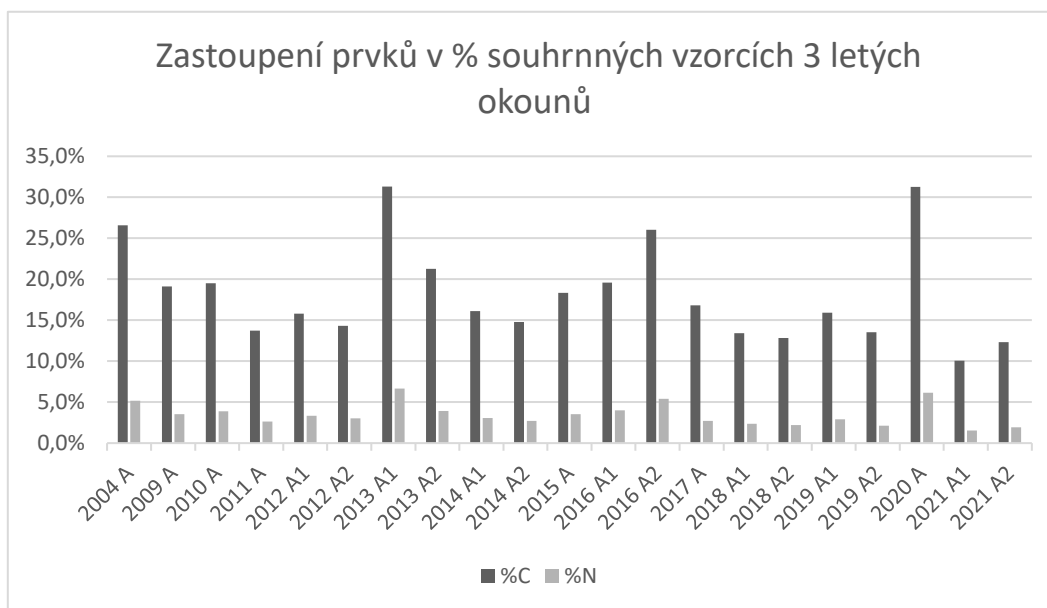
$\delta^{13}\text{C}$  se během let také vyvíjí, její vývoj je patrný z grafu 4. V letech prvních odlovů byly otolity více obohaceny těžším izotopem uhlíku než v recentních letech, kde je ochuzení o  $^{13}\text{C}$  výraznější. Hodnoty kolísají během let velmi nepravidelně a jsou v rozmezí 23,07 až 26,04‰.



Graf 4: Vývoj hodnot  $\delta^{13}\text{C}$  během let z otolitů odebraných 3 letým okounům z jednotlivých let. Písmeno A značí, že se jedná o tříletého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.



Graf 5: Vývoj hodnot  $\delta^{15}\text{N}$  během let z otolitů odebraných 3 letým okounům. Písmeno A značí, že se jedná o 3letého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.



Graf 6: Procentuální zastoupení C a N v souhrnných vzorcích od tříletých okounů v daných letech.

Písmeno A značí, že se jedná o 3letého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.

$\delta^{15}\text{N}$  také během let prochází vývojem, jak je patrné z grafu 5. Na rozdíl od uhlíku dochází k obohacování těžším izotopem podle trendu. Přesto je vzorek z roku 2004 výrazněji obohacen o  $^{15}\text{N}$  než následující roky. Poté dochází k postupnému nárůstu v obsahu  $^{15}\text{N}$  a následnému poklesu u roku 2021. Rozmezí hodnot je od 10,09 do 13,96‰.

Trend vývoje je výraznější v grafu 5, stejně tak návaznost jednotlivých hodnot z po sobě jdoucích let, je u grafu 5 patrnější než u grafu 4.

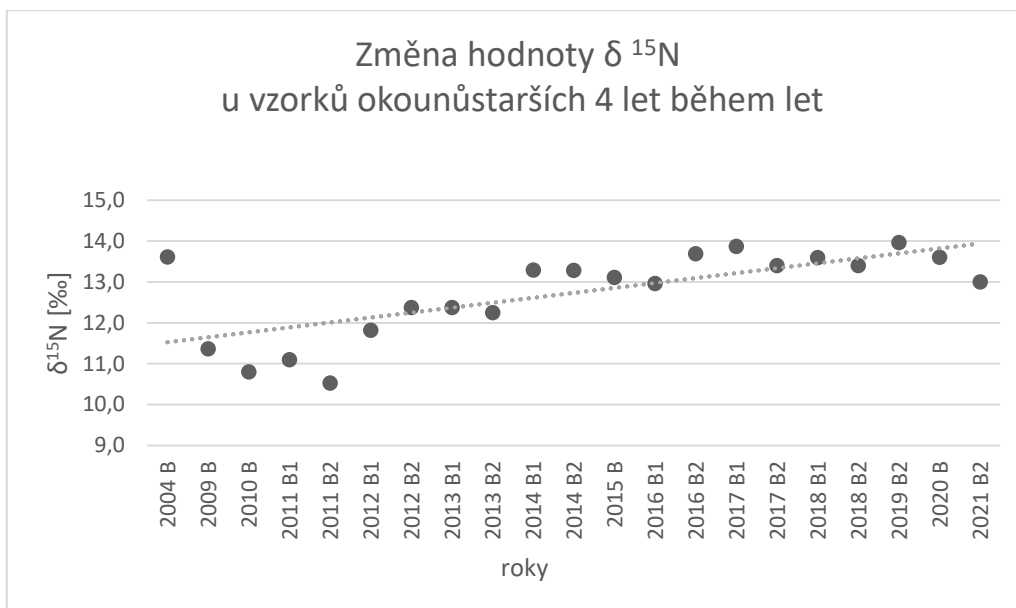
Ve vzorcích, konkrétně v SOM frakci proteinové části otolitu, je více obsažen uhlík, než dusík, jak je patrné z grafu 6. Podle trendů vývoje však dochází ke snižování obsahu obou prvků ve vzorcích, což koresponduje s obecným zmenšováním tříletých ryb, a jejich otolitů, během let odlovů. Mezi dusíkem a uhlíkem je silná korelace ( $R^2=0,9856$ ).

## 6.2 Okouni starší 4 let

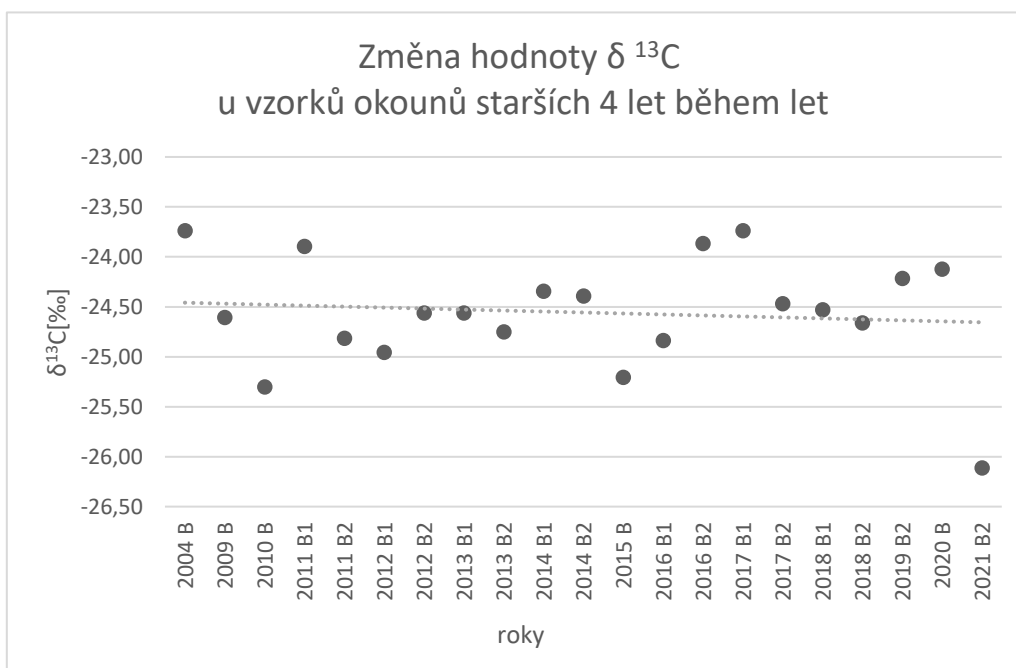
Z tabulky 4 je patrné, že obsah uhlíku ve vzorcích opět převyšuje obsah dusíku. Hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  ukazují, že jsou vzorky obohaceny o těžší izotop  $^{15}\text{N}$ . Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  ukazují, že vzorky jsou relativně ochuzeny o těžší izotop  $^{13}\text{C}$ .

Sample	%C	%N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
2004 B	16,6 %	3,00 %	-23,74	13,6
2009 B	20,0 %	3,63 %	-24,61	11,4
2010 B	15,8 %	2,82 %	-25,30	10,8
2011 B1	14,6 %	3,14 %	-23,90	11,1
2011 B2	12,9 %	2,48 %	-24,82	10,5
2012 B1	12,9 %	2,49 %	-24,96	11,8
2012 B2	19,8 %	3,78 %	-24,56	12,4
2013 B1	16,8 %	3,24 %	-24,56	12,4
2013 B2	16,5 %	2,98 %	-24,75	12,3
2014 B1	18,5 %	3,81 %	-24,35	13,3
2014 B2	19,1 %	3,92 %	-24,39	13,3
2015 B	17,1 %	3,27 %	-25,21	13,1
2016 B1	17,2 %	2,89 %	-24,84	13,0
2016 B2	19,0 %	3,83 %	-23,87	13,7
2017 B1	20,7 %	4,16 %	-23,74	13,9
2017 B2	17,8 %	3,03 %	-24,47	13,4
2018 B1	15,3 %	2,71 %	-24,53	13,6
2018 B2	12,3 %	2,02 %	-24,66	13,4
2019 B	22,2 %	3,94 %	-24,22	14,0
2020 B	28,2 %	5,29 %	-24,12	13,6
2021 B2	15,3 %	1,89 %	-26,11	13,0

Tab. 4: Obsahuje hodnoty vypočítané programem pro zpracovávání výsledků z hmotnostního spektrometru. V prvních dvou sloupcích je poměr obsahu uhlíku i dusíku z daných vzorků. 3. sloupeček představuje hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  ze SOM frakce souhrnného vzorku. 4. sloupeček představuje hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  ze SOM frakce souhrnného vzorku. Písmeno B značí, že se jedná o okouny starší 4 let a číslice značí, že bylo provedeno opakování.

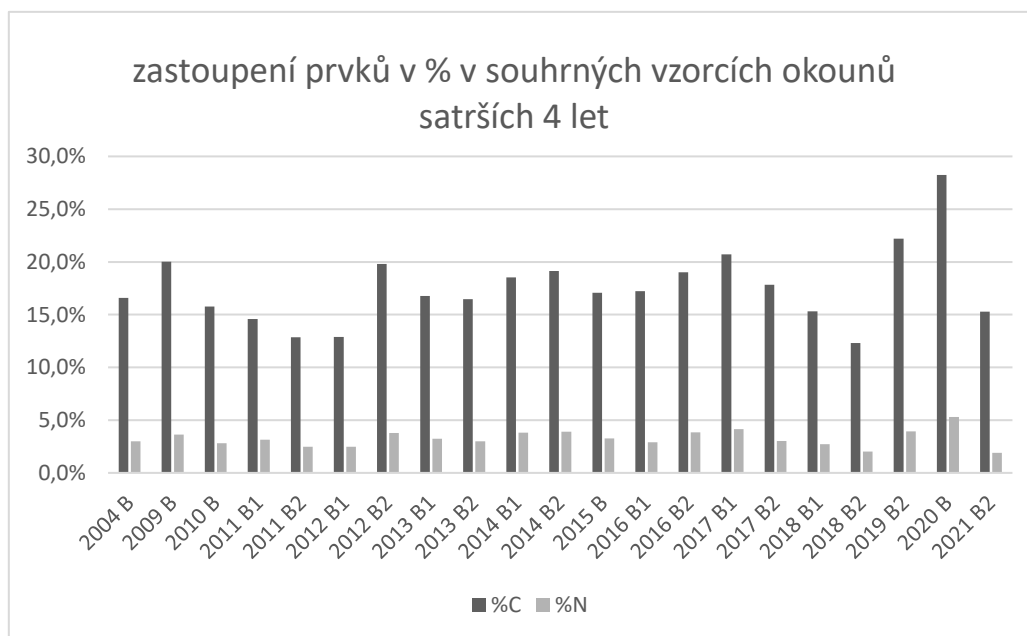


Graf 7: Hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  ze souhrnných vzorků otolitů odebraným rybám starším 4 let během odlovů v daných letech. Písmeno B značí, že se jedná o 3letého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.



Graf 8: Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  ze souhrnných vzorků otolitů odebraných rybám starších 4 let během odlovů v daných letech. Písmeno B značí, že se jedná o 3letého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.

V grafu 7 je pozorovatelný trend vývoje hodnot  $\delta^{15}\text{N}$ , který ukazuje, že během let dochází k obohacení otolitů o těžší izotop dusíku. Od roku 2004 po rok 2010 se hodnoty jeví jako klesající. Od 2011 hodnoty pozvolna stoupají. Podobně jako u grafů pro věkovou kategorii 3 je u grafu s hodnotami dusíku (graf 7) výrazně pozorovatelná návaznost hodnot z po sobě jdoucích let na rozdíl od grafu s hodnotami pro uhlík (graf 8). Z grafu 8 je pozorovatelné ochuzování o  $^{13}\text{C}$  během let.

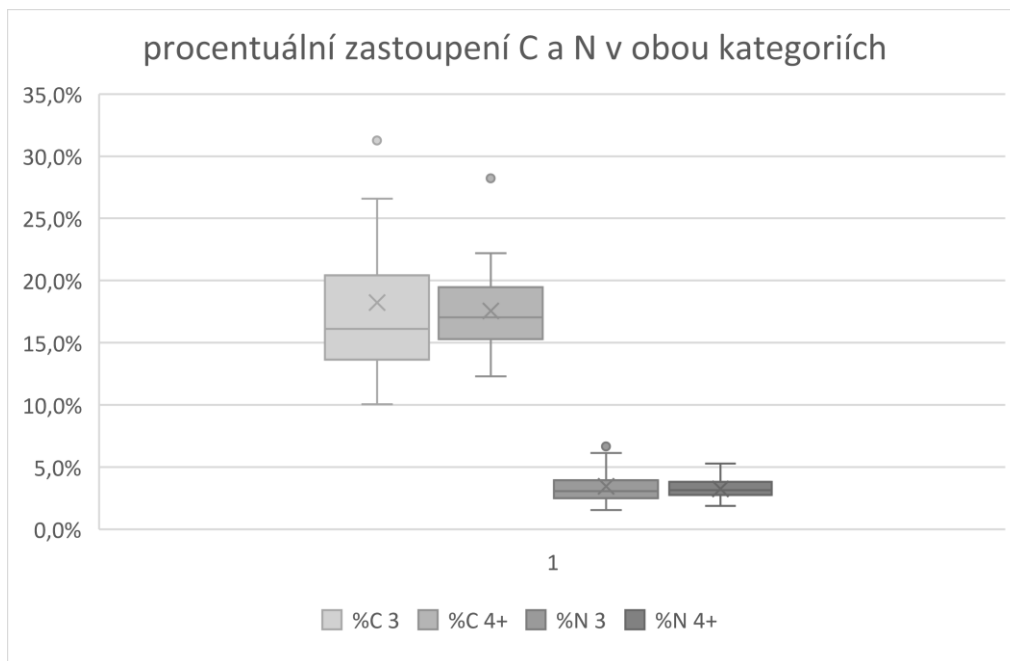


Graf 9: Procentuální zastoupení uhlíku a dusíku z otolitů souhrnných vzorků vylovených okounů v daných letech. Otolity pocházejí z ryb od 4 let věku. Písmeno B značí, že se jedná o 3letého okouna a číslice značí, že bylo provedeno opakování.

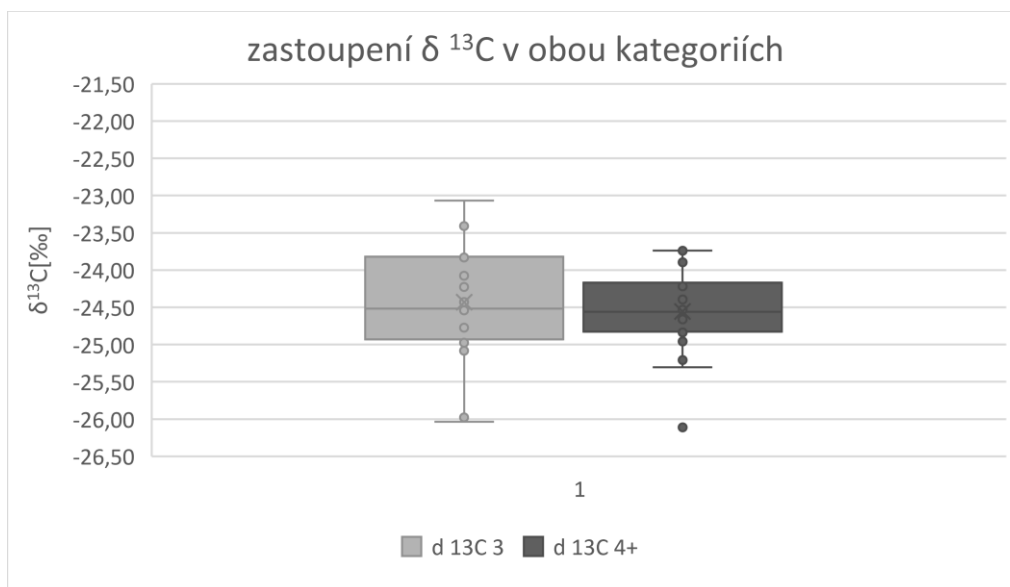
V grafu 9 je pozorovatelný trend nárůstu obsahu obou prvků. Z grafu je pozorovatelné, že obsah uhlíku a dusíku jsou spolu spjaty. To je pozorovatelné i u výsledků poměru procentuálního zastoupení C a N v grafu 6 obsahujícího hodnoty pro tříleté okouny. Korelační faktor mezi uhlíkem a dusíkem je 0,9860.



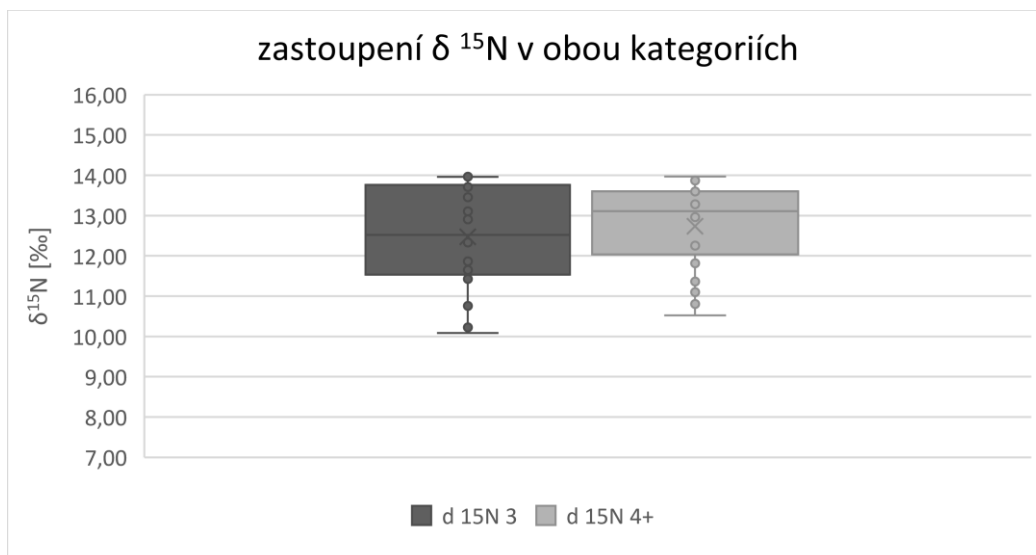
### 6.3 Porovnání výsledku 3letých okounů a okounů starších 4 let



Graf 10: Obsah uhlíku a dusíku v souhrnných vzorcích v daných letech pro výsledky otolitů odebraných ve třech letech a pro otolity odebrané okounům 4letým a starším. 4+ značí ryby z kategorie 4leté a starší.

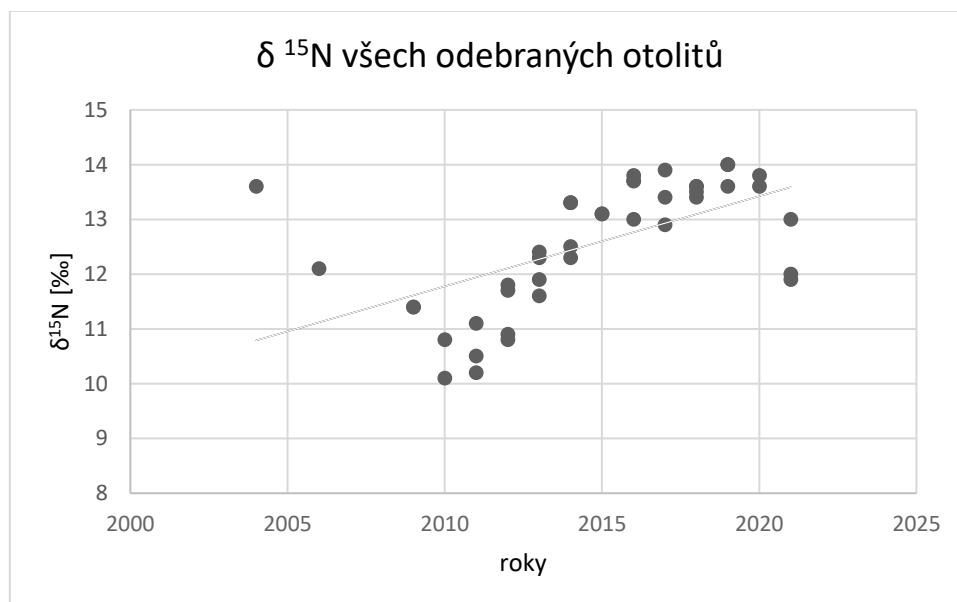


Graf 11: Rozdíl mezi  $\delta^{13}\text{C}$  u okounů tříletých a u okounů starších 4 let. 4+ značí ryby z kategorie 4leté a starší.

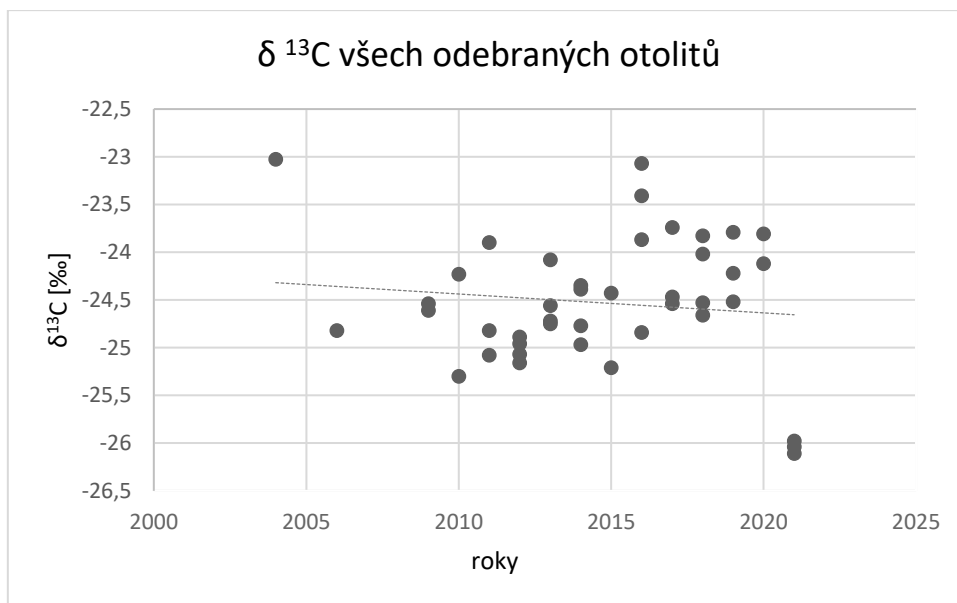


Graf 12: Rozdíl mezi  $\delta^{15}\text{N}$  u okounů tříletých a u okounů starších 4 let. . 4+ značí ryby z kategorie 4leté a starší.

Po provedení t-testu pro všechny hodnoty ze dvou kategorií, nevyšla ani u jednoho porovnání hodnota  $p$  méně než 0,05 a z toho je patrné, že mezi kategoriemi pro tříleté okouny a pro okouny starší 4 let není zásadní rozdíl. Z toho vyplývá, že je možné použít všechny hodnoty z obou kategorií dohromady.



Graf 13: Výsledky izotopové analýzy pro všechny otolity ryb odlovených během daných let.



Graf 14: Výsledky izotopové analýzy pro všechny otolity ryb odlovených během daných let.

V grafech 13 a 14 jsou výsledky pro všechny naměřené hodnoty a všechny odlovené okouny, jimž byly odebrány otolity. Z těchto celkových grafů jsou markantněji pozorovatelné trendy vývoje. Graf 13 představuje výsledky pro dusík, kde je vidět ochuzení o těžší izotop kolem roku 2010. Tento pokles je následován výrazným vzestupem s maximem přibližně v roce 2019 a následným poklesem. Trend je jasně rostoucí, tedy dochází k obohacování otolitů o těžší izotopy <sup>15</sup>N. Rozmezí hodnot pro δ<sup>15</sup>N je během let 10,1 až 14‰.

Graf 14 ukazuje klesající trend, tedy ochuzování otolitů o těžší izotop uhlíku. Ten ovšem není tak markantní jako u dusíku. Je patrné že v roce 2004 je vzorek více obohacen o těžší <sup>13</sup>C a mezi lety 2005 a 2010 došlo k ochuzení vzorku a od roku 2011 do roku 2016 se hodnoty udržovaly v rozmezí -23,9 do -25,3 ‰. Od roku 2016 bylo více vzorků opět obohaceno o <sup>13</sup>C. Velké odchýlení ukazují dvě hodnoty z roku 2021, které jsou obě okolo -26‰, tedy výrazně ochuzeny oproti ostatním vzorkům.

## 7 Diskuse

Výsledky získané během zpracování této práce měly zásadní informace o možnostech využití otolitů sladkovodních ryb pro ekologické studie. Konkrétně o možnostech týkajících se využití proteinové části otolitu, především dusíku. Jedinou nevýhodou otolitů oproti některým jiným tkáním, jako jsou například šupiny, nebo ploutevní ústřížky, zůstává nutnost usmrcení ryby k jejich odebrání (Vašek, 2017).

Je faktem, že většina sladkovodních ryb má malé otolity na rozdíl od ryb žijících v mořích a oceánech. Tudíž práce s nimi je komplikovanější, a některé úpravy není tak jednoduché provádět. Nebo by to pravděpodobně možné mohlo být, pokud bude k dispozici správné vybavení. Separace jednotlivých anulů by poskytla mnohem přesnější informace změn prostředí během života ryby (Sarakinis, 2022).

Naše souhrnné vzorky, přestože rozdělené do dvou věkových kategorií, mohou mít výsledky zatížené drobnými nepřesnostmi. Dalším problémem během použití otolitů okouna říčního je jejich poměrně malý rozměr a váha. Při použití námi vybraného postupu byla potřeba navážka 100 mg, a na tuto navážku bylo použito několik otolitů. Při snaze separovat jednotlivé anuly by bylo potřeba mít mnohonásobně více otolitů. Pořád by ale mohlo docházet k drobné odchylce, jelikož by se opět muselo pracovat se souhrnnými vzorky. Na rozdíl od zahraničních prací, kde se používají většinou otolity od jednoho jedince a mnohdy i pouze jeden otolit (Vandermyde & Whitley, 2008; Eldson 2010; Rowell, 2010; Grønkjær, 2013). Výhodou tohoto postupu je, že je dostatek materiálu pro použití a výsledky jsou lépe reprezentovatelné, díky větší přesnosti měření (Sirot, 2017).

Ovšem velikost a váha otolitu nekoresponduje vždy s velikostí ryby. To je způsobeno pravděpodobně faktem, že interakce mezi membránou otolitu a epitelem otolitického orgánu (otolit-senzorický epitel) jsou často druhově specifické. Ryby, které jsou dobrými plavci a pohybují se ve vodách velmi obratně a rychle, s častými změnami směru, mají v porovnání ke své velikosti malé otolity. To je pravděpodobně způsobeno tím, že k rychlým pohybům je potřeba, aby otolitický orgán nebyl tak citlivý ke každé reakci otolitu na plavání. Tato citlivost by u rychlých změn mohla být nevýhodou (Popper, 2005). Vztah mezi plaváním a otolitem by mohl být pravděpodobně podobný i u

sladkovodních ryb. Dalo by se z toho usuzovat, že čím agilnějším plavcem ryba je, tím menší může mít otolity v poměru k tělu. Ovšem faktem zůstává, že otolit jedince a jeho velikost je závislá na velikosti vnitřního ucha jedince, a ta je závislá na růstu jedince (Campana, 2004; Khan, 2022; Sirot, 2017). Ani naše výsledky se neliší od tohoto poznatku.

Zajímavý trend ukázal graf 3, ze kterého je patrné, že dochází ke zmenšování velikosti (SL [mm]) okounů od roku 2004 k současnosti. Tento trend může být spojen s některými vnitřně populačními vztahy, jako třeba kompetice, nebo kanibalismus. Ovšem bez většího množství doplňujících informací o dynamice populace okounů ve vodní nádrži, nemůžeme s jistotou vyhodnotit, co tento trend způsobuje. Během zpracování vzorků jsme měly k dispozici váhy otolitů a velikost ryb ze dvou kategorií. Druhá kategorie obsahovala ryby starší 4 let. Tato data však nebyla v práci použita hlavně z důvodu, že se pracovalo s průměry, a v této kategorii nebyly pouze ryby 4leté, ale ryby od 4 do 10 let. Výsledky by tedy nebyly interpretovatelné. Podobný problém se objevuje i u poměrů C a N v této kategorii. Ovšem může to pravděpodobně souviset s tím, že v této kategorii byly váhy otolitů větší.

Využití otolitů pro rekonstrukce potravních sítí je naprosto validní (Eldson, 2010; Rowell, 2010; Grønkjær, 2013; Sirot, 2017,). Má oproti využití svalů, a jiných tkání, i mnohé výhody, které byly zmíněny v kapitole otolity. Nejzásadnějším rozdílem a výhodou je jejich kontinuální přirůstání (Popper, 2005), fakt že se jedná o část těla, která nepodléhá resorpci (Murayama, 2002), a malý rozdíl izotopového signálu mezi otolitem a jinými tkáněmi (Rowell, 2010). I když se mezi autory liší hodnoty této vnitřní frakcionace, rozdíl je malý. Přesto je potvrzený v několika pracích (Eldson, 2010; Sirot, 2017). Je pravděpodobně druhově specifický a mění se i v závislosti na přijímané stravě, většinou však nepřesáhne 1‰. Různá vnitřní frakcionace dusíku během tvorby nové biomasy jedince a dorůstáním otolitu z proteinů v endolymfě není zcela pochopená (Grønkjær, 2013; Rowell, 2010; Vander Zanden, 1997). Zajímavé je, že otolit je oproti svalové tkáni ochuzený o  $^{15}\text{N}$ . V pracích používajících svalovinu i otolity vycházela SIA otolitů mezi hodnotami svaloviny a potravy (Grønkjær, 2013; Vandermyde & Whitley, 2008; Sirot, 2017). Tím pádem během použití otolitů pro analýzy trofických sítí a výpočtu trofických pozic není zcela vhodné používat zažitých 3,4 ‰ (Fry, 2006) jako hodnotu trofické

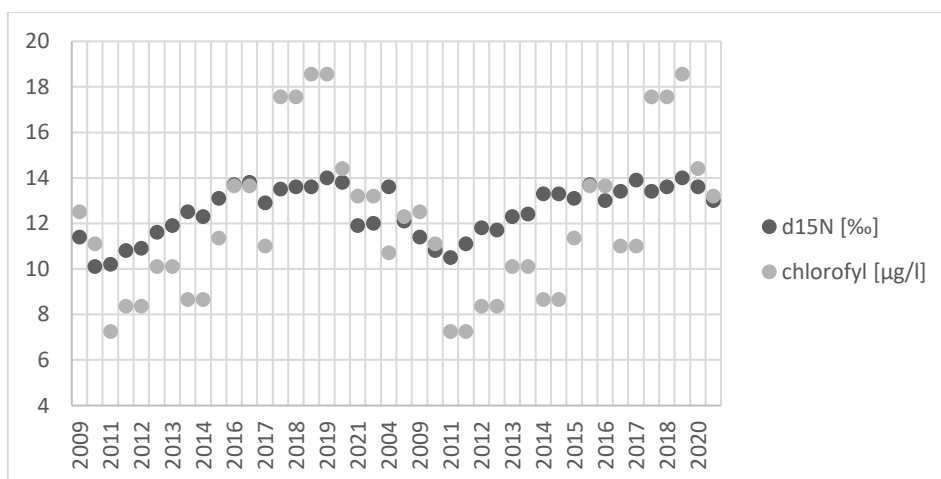
frakcionace, ale mělo by se počítat s nižšími hodnotami. Ty, jak bylo zmíněno výše, jsou však druhově a potravně specifické, takže nejde o jednoduše stanovitelnou hodnotu, pokud není k dispozici svalová hmota k porovnání. V laboratorních experimentech (jako jsou práce zmíněné výše) poměrně často dochází k získání rozdílných hodnot od hodnot získaných při práci s divoce žijícími rybami. Výsledky tak nejsou jednoduše diskutovatelné (Eldson ,2010; Zanden & Rasmussen, 2001).

V naší práci jsme neměly k dispozici doplňující vzorky pro vyhodnocení trofické pozice a trofického posunu okouna. Přesto je z našich výsledků patrné, že dochází ke změnám a vývoji v izotopovém signálu otolitů. Za předpokladu, že námi získaný izotopový signál souvisí s trofickou frakcionací otolitu vůči potravě okounů, je z výsledků zcela zřetelné, že k vývoji dochází. Naše výsledky ukazují, že od roku 2004 do roku 2011 dochází k ochuzení otolitů o  $^{15}\text{N}$  a hodnota poklesla z 13,6‰ na 10,1‰. Poté od roku 2011 do roku 2016 dochází k obohacování otolitů o těžší izotop dusíku k hodnotě mezi 13-14‰ a do roku 2019 byly hodnoty podobné. Poté ale opět dochází k ochuzení a v roce 2021 klesá hodnota  $\delta^{15}\text{N}$  na 11,9‰. Naše výsledky ovšem ukazují fluktuace během let od 10,1 do 14 ‰, což by mohlo indikovat změny v potravních vztazích, jelikož by se do tohoto rozdílu vešel posun minimálně o jednu trofickou pozici. Hodnoty dusíku navíc tvoří pozorovatelný vývoj a z toho usuzujeme, že změny v hodnotách dusíku mají návaznost a reagují na stejný podnět.

Vezmeme-li v potaz hodnoty reálné trofické frakcionace získané několika autory během experimentů v laboratorních podmínkách a menší stupeň frakcionace během přirůstání otolitů, než během přirůstání svalové hmoty, jsou naše výsledky reprezentativním ukazatelem změny v životě okounů žijících ve vodní nádrži Římov. Tato hodnota frakcionace je v případě karnivorních ryb mezi 2,5 až 3,5‰, samozřejmě záleží na dané potravě. Ku příkladu Eldson (2010) ve své práci popsal rozdíl mezi otolitem a potravou, v případě, že se jednalo o potravu živočišného původu, okolo 2,7‰. Rowell (2010) popsal výsledky obohacení okolo 2.5‰ v případě živočišné potravy. Obě tyto publikace však používaly otolity ryb žijících převážně ve slaných vodách. Ryby žijící ve sladkých vodách vykazují vyšší trofickou frakcionaci mezi potravou a svalovinou, to by znamenalo, že i frakcionace otolitů může být mírně vyšší, než bylo popsáno v těchto pracích (Zanden & Rasmussen, 2001). Na rozdíl od publikace z roku 2021 napsané Vaškem et al., ve které

byla použita SIA ke stanovení uhlíku a dusíku z archivních šupin (šupiny byly odebrány rybám žijícím ve vodní nádrži Římov) a jejich autoři nenašli žádné zásadní korelace mezi  $\delta^{15}\text{N}$  a environmentálními podmínkami. Zvýšené hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  ve tkáních ryb může také souviset s činností v okolí povodí. V případě, že je v povodí významná zemědělská činnost, dochází k obohacení toku o dusík ze zemědělství. To se poté může projevit tímto vyšším  $\delta^{15}\text{N}$  (Lake, 2002). Tento předpoklad není zcela potvrzený, i když souvislost mezi izotopovým signálem  $\delta^{15}\text{N}$  otolitů a množstvím zemědělské půdy v okolí toku, ze kterého ryby pocházely, je signifikantní (Vandermyde, 2008).

Během zpracování našich dat jsme našly poměrně významnou korelaci mezi chlorofylem a  $\delta^{15}\text{N}$  ( $R^2 = 0,6398$ ). Doplnující data nám byla poskytnuta RNDr. Znachorem, Ph.D. z biologického centra AVČR. Tato doplňující data zahrnovala i další informace o environmentálních podmínkách a ukázala další významné korelace  $\delta^{15}\text{N}$  s dalšími environmentálními faktory. S Langovým srážkovým modelem ( $R^2 = -0,742$ ), a s průměrnou teplotou ( $R^2 = 0,6631$ ). Nejzajímavější je ovšem spojitost mezi  $\delta^{15}\text{N}$  a chlorofylem.



Graf 15: Změny  $\delta^{15}\text{N}$  otolitů odebraných všem rybám během daných let a změny v obsahu chlorofylu během daných let. Vývoj  $\delta^{15}\text{N}$  mírně následuje vývoj chlorofylu.

Přes nalezenou korelaci a vizuální podobnosti mezi hodnotami pro chlorofyl a  $\delta^{15}\text{N}$  z grafu 16, není zcela jednoduše vyhodnotitelné, jak hodnoty chlorofylu (a tedy abundance fytoplanktonu) souvisí s izotopovým signálem dusíku v otolitu. Ovšem bylo

by zajímavé mít k dispozici další doplňující data, která by mohla objasnit tento vztah. Například provést SIA fytoplanktonu, zooplanktonu a dalších úrovní potravního řetězce, což by mohlo ukázat zajímavé informace o potravních vztazích ve vodních nádržích. Možné by poté bylo i bezpečněji určit, zda jsou tyto změny spojeny s narůstajícím přísunem alochtonní organické hmoty do toků a následně do vodních nádrží (Wilkinson, 2013). Vodní nádrže jsou místem, ve kterém se koncentrují živiny a látky přitékající do nich z celého povodí jejich zdroje. Další výhodou by bylo možné pochopení trofické frakcionace v prostředí sladkých vod za použití otolitů jako média, jelikož většina dostupných publikací pracuje s rybami žijícími ve slaném prostředí.

To ovšem platí pouze pro dusík. V případě měření uhlíku jsou výsledky méně předvídatelné. Když se zkoumá uhlík pomocí SIA ve vodním prostředí, jsou určité neshody mezi autory, ohledně toho, zda je možné použití SIA uhlíku pro analýzy potravních sítí, či ne. Přestože se často píše o tom, že během příjmu potravy nedochází k velké frakcionaci uhlíku (Šantrůček, 2014), jsou laboratorní experimenty potvrzující přesný opak (Grønkjær, 2013; Sirot 2017). Ve vodním prostředí jsou primárními producenty fotosyntetizující organismy. Právě fotosyntéza je jedním z procesů, během kterého dochází k největší diskriminaci, a to především u terestrických rostlin. Fytoplankton je tedy ochuzen o těžší izotop, a rozmezí jeho hodnot  $\delta^{13}\text{C}$  je za normálních podmínek -30 až -25‰. Tomu by měla odpovídat i každá další trofická pozice za předpokladu, že trofická frakcionace je přibližně nulová (Post, 2002; Fry, 2006; Šantrůček, 2014).

Některé práce zaměřující se na stabilní izotopy v potravních sítích prezentují jiné výsledky (Eldson, 2010; Sweeting, 2007). Většina těchto publikací zaměřujících se na stanovení hodnoty frakcionace mezi potravou a otolitem získaly variabilní výsledky. Převážná většina z nich se však shodla, že dochází k obohacování o těžší izotop  $^{13}\text{C}$  (Sirot, 2017). Opět autoři těchto publikací našli podobný vztah mezi  $\delta^{13}\text{C}$  potravou a  $\delta^{13}\text{C}$  otolitů.

U přijímané potravy tvořené převážně rostlinnou složkou bylo obohacení o těžší izotop mnohem významnější než u stravy tvořené převážně organismy (stravy bohaté na živočišné bílkoviny). Ovšem u dusíku byla frakcionace pro všechny typy potravy v rozmezí cca 4‰, kdežto u uhlíku jsou rozmezí hodnot frakcionace pro dané typy



potravy až 7‰ (Sirot, 2017). S tím úplně nekorespondují naše výsledky. Naše otolity ve svém signálu  $\delta^{13}\text{C}$  měly od maximální naměřené hodnoty po minimální naměřenou hodnotu okolo 3‰. To může ale souviset i s tím, že u ryb mořských probíhá frakcionace jiným způsobem než u ryb sladkovodních. Dalším velkým rozdílem opět je, že tyto výsledky byly získány pomocí laboratorních experimentů a jejich získané výsledky jsou také rozdílné od výsledků z přírodních podmínek (Zanden & Rasmussen, 2001). Nejvíce souvislá návaznost hodnot na sebe je pro námi získané výsledky  $\delta^{13}\text{C}$  v grafu 4, který obsahuje výsledky pro tříleté okouny. Z tohoto grafu je patrné ochuzení o těžší izotop od roku 2004 do roku 2014 s mírným obohacením v roce 2013 hodnoty klesaly od  $-23,3$  do  $-25,07$ ‰. Poté došlo opět k nárůstu do roku 2016, kdy byly otolity nejvíce obohaceny o těžší izotop a hodnota stoupla na  $23,07$ ‰. Poté se objevuje ochuzení až na hodnotu  $26,04$ ‰. Se zdrojem uhlíku ve vodní nádrži může souviset hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  fytoplanktonu. Když je zdroj autochtonní je fytoplankton o  $^{13}\text{C}$  ochuzen. Když dojde k rapidnímu zvýšení přísunu živin fytoplankton přestane diskriminovat  $^{13}\text{C}$  a je o něj obohacen (O'reilly, 2002). Pokud bychom tedy vzaly naše výsledky a předpokládaly, že báze potravní sítě je právě fytoplankton, mohly bychom se pokusit představit si výkyvy hodnot jako reakce na přísun živin. Nemáme ovšem dostatek dat pro vyvození závěrů, a šlo by o velmi nepřímé dokazování, takže jsme souvislost zavrhnly.

Námi získané výsledky nekorespondují s výsledky získané Vaškem et. al (2021). Jeho výsledky  $\delta^{13}\text{C}$  korelovaly s environmentálními faktory, například s chlorofylem. Tato rozdílnost mezi výsledky může být pravděpodobně dána rozdílem mezi šupinami a otolity, nebo možná tím, že použili z každé archivní šupiny pouze poslední anulus, zatímco naše vzorky obsahovaly informace o několika rocích. Nejpravděpodobnějším důvodem by mohlo být použití jiných druhů ryb. Konkrétně ryb, které nejsou primárně dravé, ale planktivorní.

Přestože takový pokles v roce 2021 byl i u hodnot naměřených pro dusík, nebyla objevena žádná významná korelace mezi hodnotami  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$  ( $R^2= 0,4773$ ). Ani korelace mezi  $\delta^{13}\text{C}$  a doplňujícími daty informujícími o environmentálních faktorech.

Naše předpoklady o vývoji a možném pozorovatelném trendu vývoje u  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^{15}\text{N}$  z archivních otolitů se potvrdily. Přestože hodnoty získané pro uhlík neposkytly příliš mnoho objasňujících informací o potravních vztazích okounů a ani o vlivu

environmentálních faktorů, je z našich výsledků pozorovatelný trend ochuzování otolitů o těžší izotop uhlíku. Dalším naším předpokladem bylo, že v otolitech je dostatek dusíku pro změření  $\delta^{15}\text{N}$  a  $\delta^{13}\text{C}$  zároveň. To se po správném upravení vzorků také podařilo. I když v práci, ze které jsme čerpaly, při úpravě vzorku oddělovaly SOM a IOM jim se podařilo získat výsledky pro obě frakce (Grønkjær, 2013). Zatímco nám se podařilo získat výsledky pouze pro SOM. Ovšem po porovnání s další publikací používající ten samý postup bylo zjištěno, že ve své práci publikovali autoři pouze výsledky SOM (Siroť, 2017). Je tedy možné, že se jim nepodařilo získat výsledky pro IOM, stejně jako nám. Otázkou zůstává, zda je to dané specifickými druhovými rozdíly v obsahu proteinů v otolitu, nebo nějaké chybě v provedení postupu.

Posledním naším předpokladem bylo, že k recentním rokům bude  $\delta^{15}\text{N}$  narůstat. Tedy bude docházet k obohacování otolitů o těžší  $^{15}\text{N}$ . Předpoklad se také ukázal jako pravdivý. Toto těžknutí izotopového signálu nemůžeme sice konkrétně spojit s žádnou další námi získanou hodnotou, ale domníváme se, že to může souviset s narůstajícím přítokem alochtonní organické hmoty do vodní nádrže. S nárůstem organické hmoty se naruší potravní síť. Místo původní báze, která je pravděpodobně fytoplanktonní se díky tomu, že dojde k obohacení potravních zdrojů alochtonními organickými látkami, zvýší přísun potravy pro mikrobiální společenstva. Tím dojde k posunu báze potravní sítě z fytoplanktonních organismů na mikroorganismy, kteří jsou poté potravou pro prvoky a ti následně pro vířníky. Tyto drobné organismy jsou poté potravou pro zooplanktonní organismy. Tím dojde k navýšení trofických členů a zvýší se počet konzumentů v takovém potravním vztahu. Právě zvýšený počet konzumentů by se projevil jako vyšší hodnota  $\delta^{15}\text{N}$ . Takový posun by mohly indikovat naše výsledky (Vašek, 2021; Wilkinson, 2013).

## 8 Závěr

Námi získané výsledky mají převážně charakter výsledků z metodické práce. Je to především z toho důvodu, že s otolity do této doby nikdo v české republice nepracoval, a nebylo jisté, zda bude vůbec možné aplikovat poznatky ze zahraničních studií na otolity čistě sladkovodních ryb. Především tak malých ryb jako jsou okouni. Druhým důvodem byl fakt, že jsme nemohly provést analýzu potravní sítě, jelikož jsme neměly k dispozici žádnou bázi potravní sítě pro odečet trofické pozice z daných let. Pro budoucí provedení by bylo zásadní, aby v archivu byly i vzorky odpovídající potravě modelové ryby.

Zásadním zjištěním této práce je, že izotopová analýza dusíku z otolitů je možná. Zároveň příprava vzorků pro tento typ analýzy není nijak náročná a nevyžaduje žádné speciální vybavení laboratoře. To znamená, že její replikovatelnost je poměrně jednoduchá. Ovšem naše výsledky byly získány pouze ze SOM na rozdíl od práce Grønkjær z roku 2013, která byla požitá jako vzor pro provedení úpravy vzorků, ve které získaly výsledky i pro IOM. Faktem je, že v jejich práci byly použity k výzkumu tresky obecné, které mohou narůstat až do velikosti okolo dvou metrů. Zároveň byla jejich práce experimentální prací a chov ryb probíhal v kontrolovaných podmínkách. Pokud by se naše výsledky porovnály s potravou a provedl se na nich výpočet pro určení trofické pozice, bylo by možné určit, zda dochází v potravních sítích ve vodní nádrži Římov během daných let ke změně, nebo zůstává stejnou. Nebo by se daly použít na jinou studii zahrnující potravní vztahy, nebo jen zaměřující se na dusík a uhlík.

Díky úpravě vzorků způsobem, který jsme použily, tedy izolací organické části otolitů, bylo možné změřením vzorků zároveň pro uhlík i pro dusík. Pokud by se tato úprava neudělala, uhlíku by bylo ve vzorku v takovém množství, že by se hmotnostní spektrometr nedal nastavit takovým způsobem, aby bylo možné změřit hodnoty pro oba prvky zároveň. Dusík by byl vždy pod detekcí. Díky této úpravě bylo možné získat informace o izotopovém signálu pro oba prvky. Zároveň nám analýza několika let poskytla řadu dat tvořící průběh výkyvů hodnot  $\delta$  z nichž bylo možné získat trend vývoje pro oba prvky.

Při původním rozmyšlení se nad prací bylo našim cílem použít okouny pouze tříleté, s tím, že jsme doufaly, že se nám podaří najít někoho, kdo by byl schopen nám pomoci

s oddělením jednotlivých anulů od sebe. Ale otolity byly příliš malé. Tudíž práce s nimi nebyla tak jednoduchá. Z toho důvodu jsme pracovaly s rozdělenými kategoriemi. Při porovnání kategorií jsme také došly k závěru, že kategorie se od sebe zásadně neliší. Tím byl vyvrácen náš předpoklad, že mezi věkovými kategoriemi bude zásadní rozdíl. I když je tento výsledek logický, protože ryby žily ve stejném prostředí během stejných let. Ovšem ostatní naše předpoklady se potvrdily.

Otolity podle většiny zahraničních autorů skrývají velký potenciál. Přestože se zkoumají již od padesátých let dvacátého století. Jejich využití v ekologických studiích je zatím stále poměrně novou disciplínou. Je to i proto, že celý proces jejich biokrystalizace není ještě zcela prozkoumán. Ovšem v zahraničí, a to především u mořských ryb, jsou používány nejen v laboratorních experimentech, ale i u volně žijících ryb, a to s prokazatelnými výsledky. Z toho důvodu bylo vhodné zaměřit se na otolity i v podmínkách sladkých vod a u sladkovodních ryb. Výsledky by mohly přinést zásadní poznání v rybí ekologii, a to nejen v potravní ekologii, ale i ohledně vlivu okolního prostředí na ryby. Především v takových ekosystémech, jakými jsou vodní nádrže. Jedinou překážkou jsou oproti mořským rybám malé rozměry otolitů a s tím i potřeba použití více kusů pro provedení analýzy.

## Literatura

Campana, S. E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188, 263-297.

Campana, S. E. (2004). Photographic atlas of fish otoliths of the Northwest Atlantic Ocean (No. 133). *NRC Research Press*.

Cheng, L. C., Shiao, J. C., Hsiao, S. S. Y., & Wang, P. L. (2018). Fractionation of otolith nitrogen stable isotopes measured by peroxodisulfate oxidation-bacterial conversion and isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(22), 1905-1910.

Ceccuzzi, P., Terova, G., Brambilla, F., Antonini, M., & Saroglia, M. (2011). Growth, diet, and reproduction of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Varese, northwestern Italy. *Fisheries Science*, 77(4), 533-545.

Craig, J. F. (1977). Seasonal changes in the day and night activity of adult perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*, 11(2), 161-166.

Cunjak, R. A., Roussel, J. M., Gray, M. A., Dietrich, J. P., Cartwright, D. F., Munkittrick, K. R., & Jardine, T. D. (2005). Using stable isotope analysis with telemetry or mark-recapture data to identify fish movement and foraging. *Oecologia*, 144(4), 636-646.

Dannevig, E. H. (1956). Chemical composition of the zones in cod otoliths. *ICES Journal of Marine Science*, 21(2), 156-159.

Dunkelberger, D. G., Dean, J. M., & Watabe, N. (1980). The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology*, 163(3), 367-377.

Elsdon, T. S., Ayvazian, S., McMahon, K. W., & Thorrold, S. R. (2010). Experimental evaluation of stable isotope fractionation in fish muscle and otoliths. *Marine Ecology Progress Series*, 408, 195-205.

Elsdon, T. S., Wells, B. K., Campana, S. E., Gillanders, B. M., Jones, C. M., Limburg, K. E., & Walther, B. D. (2008). Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and marine biology*, 303-336.

Fey, D. P., Greszkiewicz, M., & Lejk, A. M. (2022). Stress induced by substantial skeletal deformities in pike fry is not reflected in otolith fluctuating asymmetry: An experiment and literature review. *Fisheries Research*, 254, 106387.

Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology* (Vol. 521, p. 318). New York: Springer.

Gauldie, R. W., & Nelson, D. G. A. (1990). Otolith growth in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 97(2), 119-135.

Gannes, L. Z., O'Brien, D. M., & Del Rio, C. M. (1997). Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, 78(4), 1271-1276.

Grønkjær, P., Pedersen, J. B., Ankjærø, T. T., Kjeldsen, H., Heinemeier, J., Steingrund, P., ... & Christensen, J. T. (2013). Stable N and C isotopes in the organic matrix of fish otoliths: validation of a new approach for studying spatial and temporal changes in the trophic structure of aquatic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(2), 143-146.

Hoffman, J. (2016). Tracing the origins, migrations, and other movements of fishes using stable isotopes. *An introduction to fish migration*, 169-196.

Jolivet, A., Bardeau, J. F., Fablet, R., Paulet, Y. M., & de Pontual, H. (2008). Understanding otolith biomineralization processes: new insights into microscale spatial distribution of organic and mineral fractions from Raman microspectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3), 551-560.

Khan, S., Jawad, L. A., Khan, M. A., & Ankita, A. (2022). The relationship between fish length and otolith size and weight of the two nearly threatened siluriformes species *Ailia coila* (Ailiidae) and *Ompok pabda* (Siluridae) collected from the Ganga River at Narora, India. *Proceedings of the Zoological Institute RAS*, 326(2), 78-85.

- Lake, J. L., McKinney, R. A., Osterman, F. A., Pruell, R. J., Kiddon, J., Ryba, S. A., & Libby, A. D. (2001). Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *58*(5), 870-878.
- Mayer-Gostan, N., Kossmann, H., Watrin, A., Payan, P., & Boeuf, G. (1997). Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell and tissue research*, *289*(1), 53-61.
- McMahon, K. W., Fogel, M. L., Johnson, B. J., Houghton, L. A., & Thorrold, S. R. (2011). A new method to reconstruct fish diet and movement patterns from  $\delta^{13}\text{C}$  values in otolith amino acids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *68*(8), 1330-1340.
- McCutchan Jr, J. H., Lewis Jr, W. M., Kendall, C., & McGrath, C. C. (2003). Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, *102*(2), 378-390.
- Mugiya, Y., & Uchimura, T. (1989). Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Fish Biology*, *35*(6), 813-818.
- Mugiya, Y., Watabe, N., Yamada, J., Dean, J. M., Dunkelberger, D. G., & Shimizu, M. (1981). Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *68*(4), 659-662.
- Murayama, E., Takagi, Y., Ohira, T., Davis, J. G., Greene, M. I., & Nagasawa, H. (2002). Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *European Journal of Biochemistry*, *269*(2), 688-696.
- Oliveira, A. M., Farina, M., Ludka, I. P., & Kachar, B. (1996). Vaterite, calcite, and aragonite in the otoliths of three species of piranha. *Naturwissenschaften*, *83*(3), 133-135.
- O'reilly, C. M., Hecky, R. E., Cohen, A. S., & Plisnier, P. D. (2002). Interpreting stable isotopes in food webs: recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnology and oceanography*, *47*(1), 306-309.
- Pannella, G. (1971). Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, *173*(4002), 1124-1127.

Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics*, 293-320.

Pisam, M., Jammet, C., & Laurent, D. (2002). First steps of otolith formation of the zebrafish: role of glycogen?. *Cell and tissue research*, 310(2), 163-168.

Pisam, M., Payan, P., LeMoal, C., Edeyer, A., Boeuf, G., & Mayer-Gostan, N. (1998). Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*. *Cell and tissue research*, 294(2), 261-270.

Persson, L., Byström, P., & Wahlström, E. (2000). Cannibalism and competition in Eurasian perch: population dynamics of an ontogenetic omnivore. *Ecology*, 81(4), 1058-1071.

Popper, A. N., Fay, R. R., Platt, C., & Sand, O. (2003). Sound detection mechanisms and capabilities of teleost fishes. In *Sensory processing in aquatic environments* (pp. 3-38). Springer, New York, NY.

Popper, A. N., Platt, C., & Saidel, W. M. (1982). Acoustic functions in the fish ear. *Trends in Neurosciences*, 5, 276-280.

Popper, A. N., Ramcharitar, J., & Campana, S. E. (2005). Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Marine and freshwater Research*, 56(5), 497-504.

Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703-718.

Radtko, R. L., & Dean, J. M. (1982). Increment formation in the otoliths of embryos, larvae and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Fishery Bulletin*, 80(2), 201.

Říha, M., Kubečka, J., Vašek, M., Mrkvička, T., Prchalová, M., ... & Tušer, M. (2009). Long-term development of fish populations in the Římov Reservoir. *Fisheries Management and Ecology*, 16(2), 121-129.

Sarakinis, K. G., Taylor, M. D., Johnson, D. D., & Gillanders, B. M. (2022). Determining population structure and connectivity through otolith chemistry of stout whiting, *Sillago robusta*. *Fisheries Management and Ecology*.



- Sasagawa, T., & Mugiya, Y. (1996). Biochemical properties of water-soluble otolith proteins and the immunobiochemical detection of the proteins in serum and various tissues in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries science*, 62(6), 970-976.
- Šimek, K., Hornák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Znachor, P., Hejzlar, J., & Sed'a, J. (2008). Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir. *Aquatic microbial ecology*, 51(3), 249-262. *ecology*, 51(3), 249-262.
- Solomon, C. T., Weber, P. K., Cech, Jr, J. J., Ingram, B. L., Conrad, M. E., Machavaram, M. V., ... & Franklin, R. L. (2006). Experimental determination of the sources of otolith carbon and associated isotopic fractionation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(1), 79-89.
- Souza, A. T., Soukalová, K., Děd, V., Šmejkal, M., Blabolil, P., Říha, M., (2020). Ontogenetic and interpopulation differences in otolith shape of the European perch (*Perca fluviatilis*). *Fisheries Research*, 230, 105673.
- Sweeting, C. J., Barry, J., Barnes, C., Polunin, N. V. C., & Jennings, S. (2007). Effects of body size and environment on diet-tissue  $\delta^{15}\text{N}$  fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(1), 1-10.
- Stooke-Vaughan, G. A., Obholzer, N. D., Baxendale, S., Megason, S. G., & Whitfield, T. T. (2015). Otolith tethering in the zebrafish otic vesicle requires Otogelin and  $\alpha$ -Tectorin. *Development*, 142(6), 1137-1145.
- Šantrůček, J., & Šantrůčková, H. (2014). Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice*.
- Thomas, O. R., & Swearer, S. E. (2019). Otolith biochemistry—a review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(4), 458-489.
- Thomas, O. R., Swearer, S. E., Kapp, E. A., Peng, P., Tonkin-Hill, G. Q., Papenfuss, A., ... & Roberts, B. R. (2019a). The inner ear proteome of fish. *The FEBS journal*, 286(1), 66-81.
- Rowell, K., Dettman, D. L., & Dietz, R. (2010). Nitrogen isotopes in otoliths reconstruct ancient trophic position. *Environmental biology of fishes*, 89(3), 415-425.

Sirot, C., Grønkjær, P., Pedersen, J. B., Panfili, J., Zetina-Rejon, M., Tripp-Valdez, A., Darnaude, A. M. (2017). Using otolith organic matter to detect diet shifts in *Bardiella chrysoura*, during a period of environmental changes. *Marine Ecology Progress Series*, 575, 137-152.

Tohse, H., Murayama, E., Ohira, T., Takagi, Y., & Nagasawa, H. (2006). Localization and diurnal variations of carbonic anhydrase mRNA expression in the inner ear of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(3-4), 257-264.

Vander Zanden, M. J., Cabana, G., & Rasmussen, J. B. (1997). Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and literature dietary data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(5), 1142-1158.

Vandermyde, J. M., & Whitley, G. W. (2008). Otolith  $\delta^{15}\text{N}$  Distinguishes Fish from Forested and Agricultural Streams in Southern Illinois. *Journal of Freshwater Ecology*, 23(2).

Vašek, M., Eloranta, A. P., Vejříková, I., Blabolil, P., Říha, M., Jůza, T., ... & Peterka, J. (2018). Stable isotopes and gut contents indicate differential resource use by coexisting asp (*Leuciscus aspius*) and pikeperch (*Sander lucioperca*). *Ecology of Freshwater Fish*, 27(4), 1054-1065.

Vašek, M., Souza, A. T., Říha, M., Kubečka, J., Znachor, P., & Hejzlar, J. (2021). Stable isotope evidence from archived fish scales indicates carbon cycle changes over the four-decade history of the Římov Reservoir (Czechia). *Science of The Total Environment*, 755, 142550.

Vašek, M., Vejřík, L., Vejříková, I., Šmejkal, M., Baran, R., Muška, M., ... & Peterka, J. (2017). Development of non-lethal monitoring of stable isotopes in asp (*Leuciscus aspius*): a comparison of muscle, fin and scale tissues. *Hydrobiologia*, 785(1), 327-335.

Wang, X., Tan, Y., Sievers, Q., Sievers, B., Lee, M., Burrall, K., & Schreiber, A. M. (2011). Thyroid hormone-responsive genes mediate otolith growth and development during flatfish metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(1), 163-168.

Weigele, J., Franz-Odenaal, T. A., & Hilbig, R. (2017). Formation of the inner ear during embryonic and larval development of the cichlid fish (*Oreochromis mossambicus*). *Connective Tissue Research*, *58*(2), 172-195.

Wilkinson, G. M., Pace, M. L., & Cole, J. J. (2013). Terrestrial dominance of organic matter in north temperate lakes. *Global Biogeochemical Cycles*, *27*(1), 43-51.

Zanden, M. J. V., & Rasmussen, J. B. (2001). Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology and oceanography*, *46*(8), 2061-2066.